台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.70 No.3 2021

Research Articles

157 Redescription of *Podontia lutea* (Olivier, 1790) and *P. dalmani* Baly, 1865 (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini), with Notes on the Biology of *P. lutea*
Chi-Feng Lee and Su-Fang Yu

170 Study on the Mixed-Line Cultivation Model of Rice Variety 'Tainung 82' Mutant Lines for Resistance of Blast and Grain Yield
Dah-Jing Liao and Yong-Pei Wu

182 Establishment of a Doubled Haploid Mutagenesis Platform in Cauliflower
Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, Shiow-Huey Hseu, Chen-Yu Lin, Chin-Yi Tsao, and Tzu-Kai Lin

196 *Corynespora cassiicola* Causes Dieback on Basil
Jia-Rong Tang, Shu-Fen Tsai, Szu-Yu Chen, and I-Sheng Feng

206 Using Transient Expression and Transfection System of Melon Protoplasts for Rapid Evaluation of Genome Editing
Shuen-Chi You, Yi-Wen Wang, Ssu-Yu Lin, Ching-Yi Huang, and Da-Gin Lin

217 Sampling Plan for Thrips (Thysanoptera: Thripidae) on Yardlong Bean in Southern Taiwan
Hsin-Shun Lai and Feng-Chyi Lin

ISSN 0022-4847
9770022484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.70 No.3 2021

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.70 No.3 2021

研究報告

157 大黃葉蚤 [*Podontia lutea* (Olivier, 1790)] 和褐帶凹緣葉蚤 [*P. dalmani* Baly, 1865] 的重新描述與大黃葉蚤的生物學注解 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族)
李奇峰、余素芳

170 水稻「台農82號」誘變系與混系栽培下的稻熱病抗病性及產量表現之研究
廖大經、吳永培

182 花椰菜雙單倍體誘變平台建立
夏奇鈮、陳威臣、許秀惠、林楨祐、曹進義、林子凱

196 由 *Corynespora cassiicola* 引起之羅勒枝枯病
湯佳蓉、蔡淑芬、陳思妤、馮繹升

206 以甜瓜原生質體短暫性表現轉殖系統快速評估基因編輯效果
游舜期、王怡雯、林思妤、黃慶儀、林大鈞

217 台灣南部長豇豆園內薊馬類 (Thysanoptera: Thripidae) 的取樣計畫
賴信順、林鳳琪

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

謝廷芳／農業試驗所植物病理組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

黃莉欣／農業藥物毒物試驗所農藥應用組

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第七十卷　第三期　　中華民國一一〇年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　謝廷芳
地址　413008 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw/jtar
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　https://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　234634 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 104472 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 400002 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(3):157–169 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202109_70(3).0001

Research Article

Redescription of *Podontia lutea* (Olivier, 1790) and *P. dalmani* Baly, 1865 (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini), with Notes on the Biology of *P. lutea*

Chi-Feng Lee[1,*] and Su-Fang Yu[2]

Abstract

Lee, C. F. and S. F. Yu. 2021. Redescription of *Podontia lutea* (Olivier, 1790) and *P. dalmani* Baly, 1865 (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini), with notes on the biology of *P. lutea*. J. Taiwan Agric. Res. 70(3):157–169.

Podontia lutea (Olivier) is the largest flea beetle in the world. In addition to the penis, gonocoxae, spermatheca, abdominal ventrite VIII in females, and the abdominal ventrites II–V of both sexes are illustrated and are diagnostic based on comparisons with those of another widespread species, *P. dalmani* Baly. Detailed biological information is provided, including larval and adult feeding behaviors, host plants, and life cycle.

Key words: Leaf beetles, Taxonomy, Anacardiaceae, *Rhus succedanea*, *Rhus sylvestris*.

INTRODUCTION

The genus *Podontia* Dalman is a member of the *Blepharida*-group of genera, which are characterized by the emarginate anterior margin of the metatibial apex; elongate-oval eye shape, converging dorsally (except *Podontia*); the convex, chrysomeline appearance of the body; *Blepharida* morpho-group form of the metafemoral spring; and closed procoxal cavities in adults. These genera are also well defined by their biology, especially their shared host plant families (Anacardiaceae and Burseraceae) and their larval morphology (external leaf feeding) (Furth & Lee 2000).

Sixteen genera were listed in the *Blepharida*-group, and their biological information was reviewed by Furth (1998). The genera of the Oriental region were revised by Medvedev (1999) and three new genera were described: *Blepharella*, *Furthia*, and *Asiophrida*. The genus *Podontia* was redefined by Medvedev (1999) to include ten Asian species ranging from Indonesia to Indo-China. Of which, *P. laosensis* Scherer, 1969 was synonymized with *P. pitalohita* Maulik, 1926 [synonymized with *P. rufocastanea* Baly, 1865 by Medvedev (1999)]. The total number of valid species was thus reduced to nine.

Podontia lutea (Olivier) is a widespread species in Indo-China and East Asia (see below). Adults are reputedly the largest flea beetles in the world (Furth 1999). Its host plant was documented by Chûjô (1935). Larval morphology was studied by Takizawa (1978) and Lee (1999), respectively. However, other biological information is limited (Prathapan & Chaboo 2011), based only on field observations (Takizawa 1978) or brief descrip-

Received: April 14, 2021; Accepted: May 24, 2021.
* Corresponding author, email: chifeng@tari.gov.tw
1 Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Citizen Scientist, 4F., No. 1, Ln. 62, Xinmin Rd., Beitou Dist., Taipei, Taiwan, ROC.

tions (Hsu 1934; Lee & Cheng 2007). Although adults have been described often, only the penis was illustrated (Scherer 1969). For the present study, the diagnostic value of other genitalic characters were evaluated by comparisons with those of another widespread congener, *P. dalmani* Baly. Biological information is updated based on results of an indoor rearing study.

MATERIALS AND METHODS

A seedling of the host plant for *Podontia lutea*, *Rhus succedanea* var. *succedanea* L., was collected in the field and transferred into the second author's house for container culture. Three adults of *P. lutea* were collected in March 24, 2011 from Fushan, New Taipei City and put on the seedling for rearing.

For delimiting variability of diagnostic characters, at least one pair from each locality or color form was examined. Length was measured from the anterior margin of the eye to the elytral apex, and width at the greatest width of the elytra. All examined specimens are deposited at the insect collection, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute.

Terminology of the grooves on pronota follows Medvedev (1999).

RESULTS

Genus *Podontia* Dalman

Podontia Dalman, 1824: 23 (type species: *Galeruca grandis* Gröndal, 1808, synonymized with *Chrysomela lutea* Olivier, 1790); Chapuis, 1875: 29 (redescription); Heikertinger, 1924: 50 (key); Maulik, 1926: 220 (redescription); Chen, 1933: 215 (key); Chen, 1934a: 266 (redescription); Chûjô, 1935: 463 (catalogue); Gressitt & Kimoto, 1963: 785 (catalogue); Scherer, 1969: 166 (catalogue); Mohamedsaid, 1989: 277 (redescription); Medvedev, 1999: 179 (redefinition); Kimoto, 2000: 222 (catalogue).

Paramerista Lopatin, 2011: 143 (type species: *Paramerista luteola* Lopatin, 2011); synonymized by Bezděk (2012).

Specimens examined for comparison. In addition to *Podontia lutea* and *P. dalmani*, two more species are involved in this study: *P. affinis* (Gröndal 1808): **CHINA. Yunnan:** 1♀, Mocheng (磨整), 12.V.2018, leg. Y.-T. Wang; *P. quatuordecimpunctata* (Linnaeus, 1767): **CHINA. Yunnan:** 1♀, Manfen (曼粉), 20.IX.2017, leg. Y.-T. Wang; 1♂, Menglun (勐侖), 29.III.2018, leg. Y.-Q. Lu; 1♀, Rongshuwang (榕樹王), 11. IX.2014, leg. Y.-T. Wang; 1♂, Ruili (瑞丽), 25. IX.2013, leg. Y.-F. Hsu.

Diagnosis. Pronotum (Fig. 1) with a divided area (AL) near anterior angles delimited by longitudinal (LAL) and transverse (TAL) grooves; a longitudinal groove at appendix (AAL); basal margin with longitudinal lateral grooves (LG); central longitudinal line (CL) more or less reduced; one more groove (PG) near lateral margin behind middle. Prosternal process bifurcate. Mesoventrite (Fig. 2) with saddle-like process for receiving metasternal process. Metafemora with angular process at posterior margins near apices. Claws bifid. Tarsomeres I of front and middle legs more swollen in males (Fig. 3) than in females (Fig. 6).

Remarks. Grooves on the pronotum were used for species identities by Medvedev (1999). However, this study found that their diagnostic values are limited due to infraspecific variations. For example, AAL is absent in *P. affinis* based on the key to species made by Medvedev (1999) but it is distinct on the specimen examined. CL is deeply impressed in *P. dalmani* based on the key, but it is feeble on most of the specimens examined.

Podontia lutea (Olivier)

Chrysomela lutea Olivier, 1790: 692 (East Indies); Olivier, 1807: 539 (redescription with illustration).

Podontia lutea: Gemminger & Harold, 1876: 3522 (India or.); Heikertinger, 1924: 50 (China, Korea); Maulik, 1926: 222 (China, Myanmar, Vietnam, Taiwan; not in India); Miwa, 1931: 192 (Taiwan); Chen, 1933: 216 (China: Guizhou, Jiangxi, Sichuan, Yunnan, Zhejiang);

Chen, 1934a, 268 (catalogue); Chen, 1934b: 47 (Canton, = Guanzhou, in Guandong, China); Chûjô, 1935: 463 (Taiwan, including Lanyu island; host plant); Heikertinger & Csiki, 1940: 414 (catalogue); Chûjô, 1963: 400 (additional records in Taiwan); Gressitt & Kimoto, 1963: 786 [China: Fujian, Guandong, Hong Kong, Hubei, Shaanxi, Sichuan, Sikang (= Xikang, now combined with Sichuan), Yunnan, Zhejiang]; Scherer, 1969: 167 (Laos, Vietnam); Kimoto, 1970: 214 (additional records in Taiwan); Kimoto, 1986: 59 (additional records in Taiwan); Takizawa *et al*., 1995: 14 (additional records in Taiwan); Kimoto & Chu, 1996: 99 (catalogue); Reid, 1997: 36 (Indonesia: Kalimantan); Kimoto, 2000: 224 (catalogue); Lee & Cheng, 2007: 145 (immature stages and biology).

Galeruca grandis Gröndal, 1808: 288 (India or.), synonymized by Gemminger & Harold (1876).

Podontia grandis: Dalman, 1824: 25.

Paramerista luteola Lopatin, 2011: 143 (Chongqing, in Sichuan, China); synonymized by Bezděk (2012).

Specimens examined. CHINA. Fujian: 1♀, Houzhai (後宅), 25.VI.2014, leg. Y.-T. Chung; 1♀, Shangzhai (上寨), 1.VII.2014, leg. Y.-T. Chung; **Guangxi:** 1♂, Anjiangping (安江坪), 7.VII.2018, leg. Y.-T. Chung; 1♀, Damingshan (大明山), 28. VI.2014, leg. Y.-Q. Lu; 1♂, 1♀, same but with “13.VI.2014”; 1♀, same but with “11.IV.2016”; 1♀, same but with “22.V.2016”; 1♀, Dayaoshan (大堯山), 13.IV.2016, leg. J.-T. Zhang; 1♀, same but with “24.IV.016”; 1♀, Guiyan (鬼岩), 12. VI.2017, leg. Y.-Q. Lu; 1♀, Panwangshan (盤王山), 24.IV.2018, leg. J.-T. Zhang; 1♀, Yaoshan (堯山), 13.V.2014, leg. Y.-F. Hsu; 1♀, Zhaojiang (趙江), 14.IV.2020, leg. Y.-B. Li; **Guizhou:** 1♂, Maolan (茂蘭), 21-24.VIII.2011, leg. Y.-F. Hsu; Hainan: 1♀, Jianfengling (尖峰嶺), 10.V.2015, leg. Y.-T. Wang; **Hong Kong:** 2♂♂, 1♀, 14. V.1926, leg. S. Ishida; 2♀♀, 12.X.2009, leg. U. Ong; **Shanxi:** 1♂, Huashuping (樺樹坪), 19.VI.2020, leg. I.-T. Zhao; **Sichuan:** 2♂♂, 1♀, Jinfoshan (金佛山), 21.VII.2010, leg. W.-H. Lin; **Zhejiang:** 1♀, Hangchow (杭州), 15.IV.1932, leg. C. C. Tao; **Yunnan:** 2♂♂, 1♀, Menglun (勐侖), 16. IV.2020, leg. Y.-Q. Lu; **TAIWAN. Chiayi:** 1♂, Arisan (= Alishan, 阿里山), 12.V.1935, leg. Y. Miwa; **Ilan:** 1♂, 1♀, Riyohen (= Chinyuehtsun, 金岳村) – Rato (= Lotung, 羅東), 5.IX.1929, leg. R. Takahashi; 1♂, 5♀♀, Taiheizan (= Taipingshan, 太平山), V.1935, leg. Y. Miwa; 1♀, same locality, 10.V.1942, leg. A. Tanaka; **Hsinchu:** 1♂, Wufeng (五峰), 17.II.2009, leg. S.-F. Yu; **Kaohsiung:** 1♂, Erhchituan (二集團), 25.VIII.2012, leg. P.-H. Kuo; 1♂, Shihtung Hot Spring (石洞溫泉), 28. VI.2013, leg. Y.-F. Hsu; 1♂, Tona trail (多納林道), 24.VII.2016, leg. U. Ong; **Miaoli:** 2♂♂, 1♀, 大南庄 (Tananchuan), 12.X.1952, leg. S. C. Chiu, C. T. Lee; 3♂♂, 1♀, Tunglo (銅鑼), 9.II.2011, leg. H.-T. Shih; **Nantou:** 1♀, Horisha (= Puli, 埔里), 10.V.1913, leg. M. Maki; 1♂, 2♀♀, Lushan (廬山), 27-31.V.1980, leg. K. S. Lin & L. Y. Chou; 1♀, Musha (= Wushe, 霧社), 12.III.1927, leg. M. Kato; 1♂, same locality, 25.VI.-5. VII.1947, leg. Maa, Chen, Lin; 2♀♀, same locality, 26-28.VIII.1981, leg. L. Y. Chou & S. C. Lin; 2♀♀, Nichigetsutan (= Sunmoon Lake, 日月潭), 5-20.III.1929, leg. Y. Miwa; 1♀, same locality, 20.V.1956, leg. S. C. Chiu; **New Taipei City:** 1♀, Mt. Shiungkung (熊空山), 6.VII.2013, leg. T.-Y. Liu; 1♀, Shinten (= Hsintien, 新店), 22.IV.1936, leg. R. Takahashi; 1♀, same locality, 11.IV.1963, leg. H. H. Tseng; **Pingtung:** 1♀, Tahanshan (大漢山), 26.VII.2019, leg. Y.-T. Chung; **Taipei:** 2♀♀, Rimogan (= Fushan, 福山), 12.V. 1933, leg. M. Chujo; 1♂, same locality, 30.III. 2012, leg. C.-F. Lee; 1♂, Sozan (= Yangmingshan, 陽明山), 11.VIII.1930, leg. Y. Izumi; 5♂♂, 5♀♀, same locality, 25.X.1936, leg. M. Chujo; 1♀, same but with “18.IX.1938”; 1♂, same locality, 18.IV.1938, leg. Y. Miwa; 1♀, same but with “7.V.1938”; 1♀, same but with “27.VI.1938”; 1♀, same locality, 1.VII.2007, leg. M.-H. Tsou; 1♂, Taihoku (= Taipei, 台北), 29.I.1920, leg. Yoshida; 1♂, same locality, 20.IX.1923, leg. T. Shiraki; 1♂, same locality, 25.IV.1925, leg. M. Kato; 1♂, same locality, 10.II.1926, leg. R. Takahashi; 2♀♀, same locality, VII.1926, leg. J. Sonan; 1♂, same locality, 5.V.1930, leg. M. Chujo; **Taitung:** 1♀, Chipen (知本), 17.I.2009, leg. C.-F.

Lee; 1♂, Kotosho (= Lanyu Island), 25.IX.1928, leg. T. Okuni; 1♂, Taimali (太麻里), 12.V.2009, leg. W.-T. Liu; **VIETNAM. Vinh Phúc:** 1♂, Ngoc Than, 31.V.2014, leg. N.-Y. Tsai.

Redescription. Length 14.1–17.8 mm, width 7.7–9.3 mm. General color (Figs. 3–5) yellow; antennae black except two basal antennomeres; prosternum brown; tibiae and tarsi black. Antennae filiform in males (Fig. 9), but antennomere I strongly bent, length ratios of antennomeres I–XI 1.0 : 0.3 : 0.5 : 0.5 : 0.6 : 0.6 : 0.7 : 0.6 : 0.6 : 0.6 : 0.8, length to width ratios of antennomeres I–XI 3.2 : 1.3 : 1.9 : 2.0 : 2.0 : 2.2 : 2.5 : 2.5 : 2.6 : 2.5 : 3.0; similar in females (Fig. 10), antennomeres III–X straight, length ratios of antennomeres I–XI 1.0 : 0.3 : 0.5 : 0.5 : 0.6 : 0.6 : 0.7 : 0.6 : 0.6 : 0.6 : 0.7, length to width ratios of antennomeres I–XI 3.1 : 1.6 : 2.3 : 2.1 : 2.1 : 2.1 : 2.2 : 2.2 : 2.5 : 2.4 : 3.1. Pronotum transverse, 1.8× wider than long, lateral margin moderately rounded from apex to middle, then parallel-sided from middle to base; apical margin medially and moderately concave, basal margin medially and slightly convex. Elytra parallel-sided, 1.5× longer than wide. Tarsomeres I of front and middle legs strongly swollen in males (Fig. 17); less swollen in females (Fig. 18). Apical margin of abdominal ventrite V in males trilobed (Fig. 19), notches shallow, basal margin expanded slightly posteriorly; basal margins of other ventrites not modified; apical margin of abdominal ventrite V rounded with one pair of short ridges near middle in females, basal margin not modified (Fig. 16). Penis (Figs. 11–12) elongate, 4.3× longer than wide; parallel-sided, apically narrowed from apical 1/10, apex rounded; slightly bent at middle at lateral view; endophallic sclerites composed of three sclerites at ostium, median sclerite large, apically tapering, one pair of lateral sclerites basally connected with ostium, basally slender. Gonocoxae (Fig. 15) with only apices sclerotized, with several short setae along apical margin. Ventrite VIII (Fig. 13) membranous except speculum, with one transverse row of long setae at sides of apical margin; spiculum short and basally broadened. Receptacle of spermatheca (Fig. 14) strongly swollen, apically connected with distal spermathecal duct and basally connected with pump, inseparable between distal spermathecal duct, receptacle, and pump; pump short; distal spermathecal duct short and subapically connected with receptacle.

Diagnosis. Adults of *Podontia lutea* are similar to those of *P. flava* Baly and *P. jalur* Mohamedsaid, with yellow bodies, but they can be distinguished by the following combination of characters: black antennae, tibiae, and tarsi (yellow antennae, tibiae, and tarsi in others) and flat interspaces of elytral rows (convex interspace of elytral rows in *P. jalur*). In genitalic characters, *P. lutea* differs from *P. dalmani* by the parallel-sided penis (Figs. 11–12) [slightly concave-sided penis in *P. dalmani* (Figs. 30–31)]; gonocoxae with only apices sclerotized and with a number of short setae along apical margin (Fig. 15) [gonocoxae entirely sclerotized and with four long setae on apices in *P. dalmani* (Fig. 35)]; spermatheca with strongly swollen receptacle, short pump, and visible distal spermathecal duct (Fig. 14) [spermatheca with slightly swollen receptacle, long pump, and distal spermathecal duct not visible in *P. dalmani* (Fig. 33)]; abdominal ventrite VIII with a row of long setae along sides of apical margin in females (Fig. 13) [ventrite VIII with a clustered long setae at sides of apical margin in females of *P. dalmani* (Fig. 32)]; basal margin of abdominal ventrite V expanded moderately posteriorly, basal margins of other abdominal ventrites not modified in males (Fig. 19) [basal margin of abdominal ventrite V expanded strongly posteriorly, basal margin of ventrite IV expanded moderately posteriorly, basal margins of ventrites II and III expanded slightly in males of *P. dalmani* (Fig. 38)]; apical margin of abdominal ventrite V widely rounded and basal margin not modified in females (Fig. 16) [apical margin of abdominal ventrite V with an short median notch, basal margin expanded slightly posteriorly in females of *P. dalmani* (Fig. 34)].

Host plants. Anacardiaceae: *Rhus succedanea* var. *succedanea* L. (Chûjô 1935; Takizawa 1978; Kimoto & Takizawa 1997; Lee & Cheng 2007; present study); *R. sylvestri* Siebold & Zucc. (present study).

Biology. Eggs of *P. lutea* are deposited in masses, laid in single layer on adaxial surfaces of leaves. In the laboratory, the egg mass-

es comprised about 20 eggs. Each pale gray egg was oriented vertically (Fig. 21). Larvae hatched after 5–7 d. The neonate larvae are lemon yellow with a dark head (Fig. 22). They feed by scraping the abaxial surface of the lamina, while older larvae feed by cutting the leaf lamina (Fig. 24). Older larvae were observed singly on leaves, suggesting solitary habits. The larva with its fecal coat resembles a bird dropping (Fig. 23). The larval period varied from 23–27 d. Full fed final instar larvae shed the fecal coat (Fig. 25) and remained motionless for about 1–2 d. Prior to pupation, they wriggle on wet soil and create a small depression on the surface and gather soil particles from around the body and manipulate these with the legs and mouthparts to form a layer covering the body. Ultimately this layer becomes an earthen cocoon roughly globular in shape (Fig. 26). The larva never dug into soil, but always constructed the cocoon on the surface. The adult emerged through a nearly circular exit hole (Fig. 27). Duration from construction of the cocoon to adult emergence was 25–27 d. The total life cycle was completed in 53–61 d. Adults feed by cutting the leaf lamina. They feign death and fall (thanatosis) or jump reluctantly when disturbed. Like larvae, adults preferred to remain on the abaxial side of leaves (Fig. 20). Hsu (1934) assumed that populations in Zhejiang, China were univoltine. In Taiwan, females start to lay eggs during late March. Takizawa (1978) observed that young and mature larvae were found simultaneously on July 11, 1976 in Yangmingshan (陽明山) and on July 5–9, 1977, Tongpo (東埔), Central Taiwan. Hsueh Lee, one member of Taiwan Chrysomelid Research Team, also observed the similar situation on June, 2006, in Yangmingshan. Therefore, it is reasonable to assume that Taiwanese populations are multivoltine.

Distribution. China, Indonesia (Kalimantan), Korea, Laos, Myanmar, Taiwan, Vietnam.

Podontia dalmani Baly

Podontia dalmani Baly, 1865: 405 (Indonesia: Lombok; Thailand); Allard, 1891: 230 (Indochina); Chen, 1934a: 269 (China: Guizhou, Guangxi; Vietnam); Chen, 1939: 55 (catalogue); Gressitt & Kimoto, 1963: 786 (catalogue); Scherer, 1969: 170 (Myanmar, Laos, Vietnam, China: Hainan); Kimoto, 2000: 224 (Laos, Vietnam).

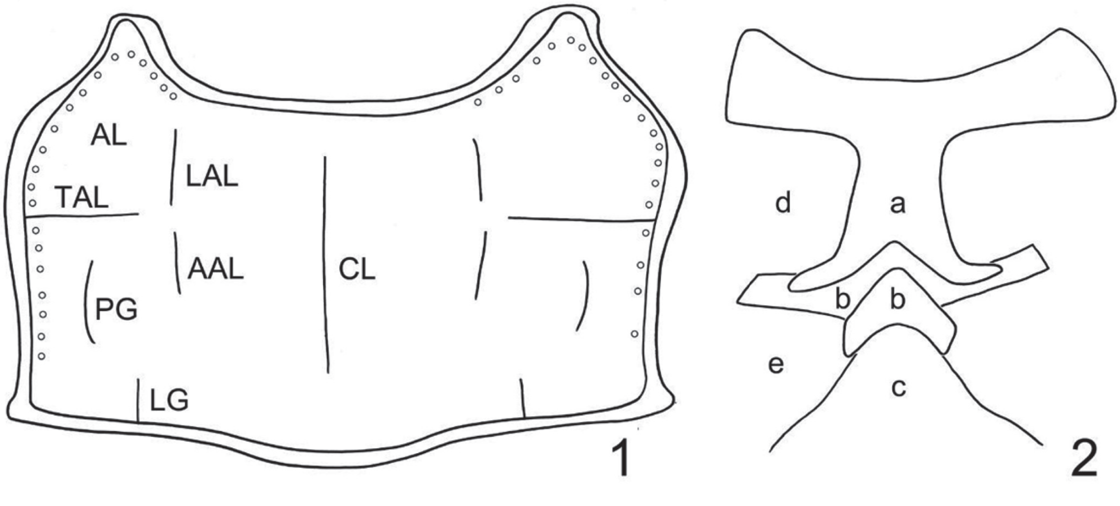
Specimens examined. CHINA. Hainan: 1♀, Wuzhishan (五指山), 3.V.2013, leg. Y.-F. Hsu; Yunnan: 2♀♀, Huayudong (花魚洞), 23.IV.2016, leg. Y.-T. Wang; 1♂, 3♀♀, Manfen (曼粉), 12.V.2016, leg. Y.-T. Wang; 1♀, Menglun (勐侖), 29.III.2018, leg. Y.-Q. Lu; 1♀, Nanxi (南溪), 30.V.2010, leg. W.-H. Lin; 1♂, Pupang (補蚌), 24.III.2018, leg. Y.-Q. Lu; **VIETNAM**. **Ninh Binh:** 1♀, Cúc Phuong N. P., 5.VI.2014, leg. N.-Y. Tsai; **Vinh Phúc**: 1♂, Ngoc Than, 31.V.2014, leg. N.-Y. Tsai.

Redescription. Length 15.7–17.3 mm, width 8.2–9.9 mm. General color (Figs. 6–8) yellowish-brown; three transverse dark brown stripes on elytra: one dark stripe at apical 1/3, sides expanding anteriorly, another dark stripe at middle, the other stripe along apices, yellowish-brown spots or longitudinal stripes present between longitudinal row of punctures. Antennae filiform in males (Fig. 28), but antennomere I strongly bent, length ratios of antennomeres I–XI 1.0 : 0.3 : 0.5 : 0.6 : 0.7 : 0.7 : 0.7 : 0.7 : 0.7 : 0.7 : 0.8, length to width ratios of antennomeres I–XI 3.3 : 1.7 : 2.9 : 3.0 : 3.3 : 3.2 : 3.3 : 3.4 : 3.6 : 3.4 : 3.9; similar in females (Fig. 29), antennomeres III–X straight, length ratios of antennomeres I–XI 1.0 : 0.3 : 0.5 : 0.5 : 0.6 : 0.6 : 0.6 : 0.6 : 0.6 : 0.6 : 0.7, length to width ratios of antennomeres I–XI 3.3 : 1.6 : 2.8 : 3.0 : 2.7 : 2.8 : 2.6 : 2.9 : 3.0 : 2.8 : 3.3. Pronotum transverse, 1.7–1.8× wider than long, lateral margin moderately rounded, widest at apical 1/3; apical margin medially and moderately concave, basal margin medially and slightly convex. Elytra parallel-sided, 1.4–1.5× longer than wide. Tarsomeres I of front and middle legs strongly swollen in males (Fig. 36); less swollen in females (Fig. 37). Apical margin of abdominal ventrite V in males trilobed (Fig. 38), notches deep, basal margin expanded strongly posteriorly; basal margins of ventrite IV expanded moderately posteriorly; basal margins of ventrites II and III expanded slightly posteriorly; apical margin with a shallow median notch in females, basal margin expanded slightly posteriorly (Fig. 34). Penis (Figs. 30–31) elongate, 4.0× longer than wide;

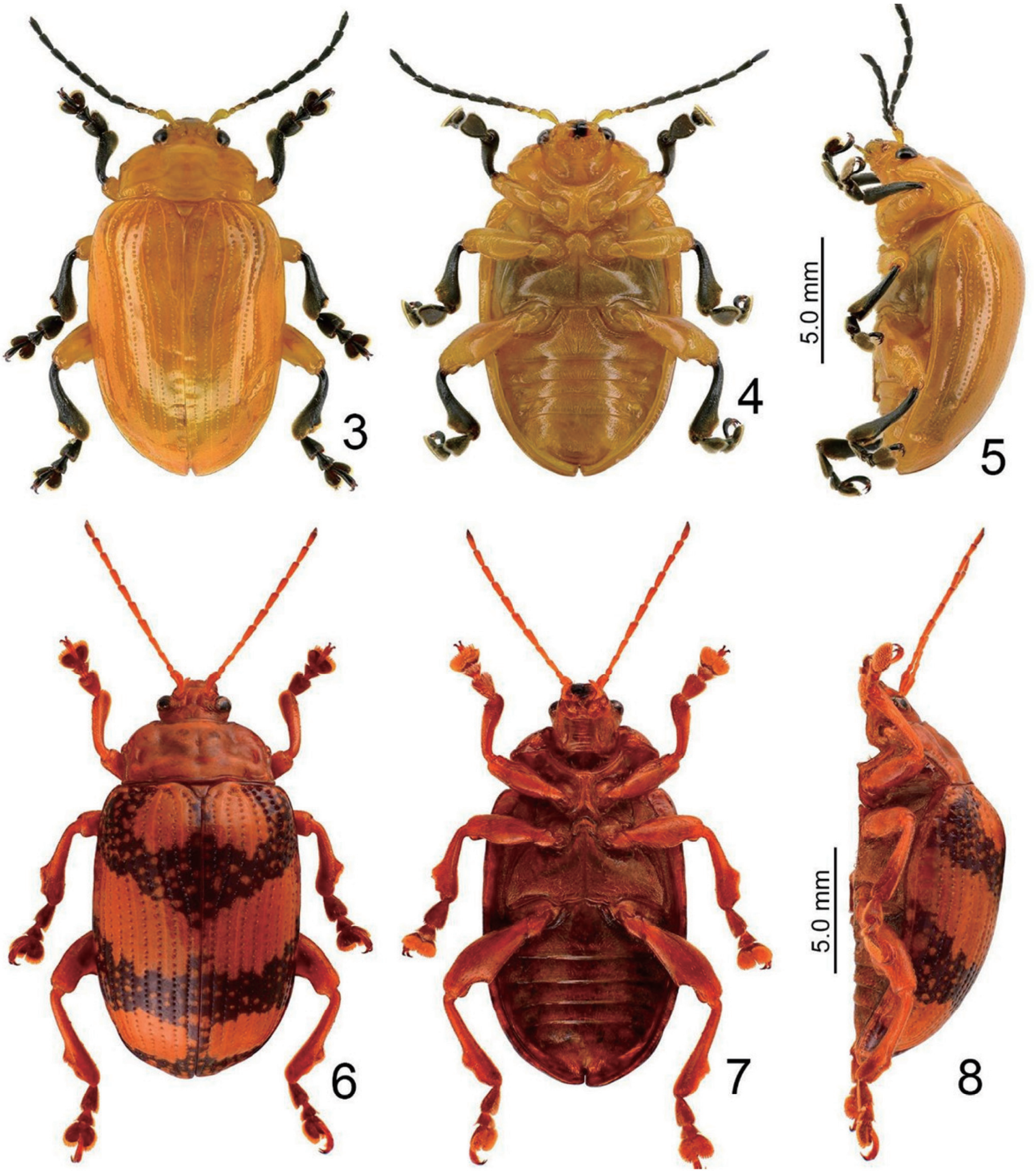
sides gradually narrowed towards apical 1/4, apically narrowed from apical 1/10, apex rounded; slightly bent in lateral view; endophallic sclerites composed of three sclerites at ostium, median sclerite large, apically tapering, one pair of lateral sclerites basally connected with ostium, basally slender. Gonocoxae (Fig. 35) well sclerotized, with four long setae at apices. Ventrite VIII (Fig. 32) membranous except speculum, with clustered long setae at sides near apical margin; spiculum short and narrow. Receptacle of spermatheca (Fig. 33) slightly swollen, apically connected with distal spermathecal duct and basally connected with pump, inseparable between distal spermathecal duct, receptacle, and pump; pump long; distal spermathecal duct entirely connected with receptacle.

Diagnosis. Adults of *Podontia dalmani* are characterized by the color pattern on the elytra. The genitalic characters of *P. dalmani* can be separated from *P. lutea* by the slightly concave-sided penis (Figs. 30–31) [parallel-sided penis in *P. lutea* (Figs. 11–12)]; gonocoxae entirely sclerotized and with four long setae on apices (Fig. 35) [gonocoxae with only apices sclerotized and with a number of short setae along apical margin in *P. lutea* (Fig. 15)]; spermatheca with strongly swollen receptacle, short pump, and visible distal spermathecal duct (Fig. 33) [spermatheca with slightly swollen receptacle, long pump, and distal spermathecal duct not visible in *P. lutea* (Fig. 14)]; abdominal ventrite VIII with a clustered long setae at sides of apical margin (Fig. 32) [abdominal ventrite VIII with a row of long setae along sides of apical margin in females in females of *P. lutea* (Fig. 13)]; basal margin of abdominal ventrite V expanded strongly posteriorly, basal margin of ventrite IV moderately expanded, basal margins of ventrites II and III slightly expanded in males (Fig. 38) [basal margin of abdominal ventrite V moderately expanded posteriorly, basal margins of other abdominal ventrites not modified in males of *P. lutea* (Fig. 19)]; apical margin of abdominal ventrite V with an short median notch, basal margin slightly expanded in females (Fig. 34) [apical margin of abdominal ventrite V widely rounded and basal margin not modified in females of *P. lutea* (Fig. 16)].

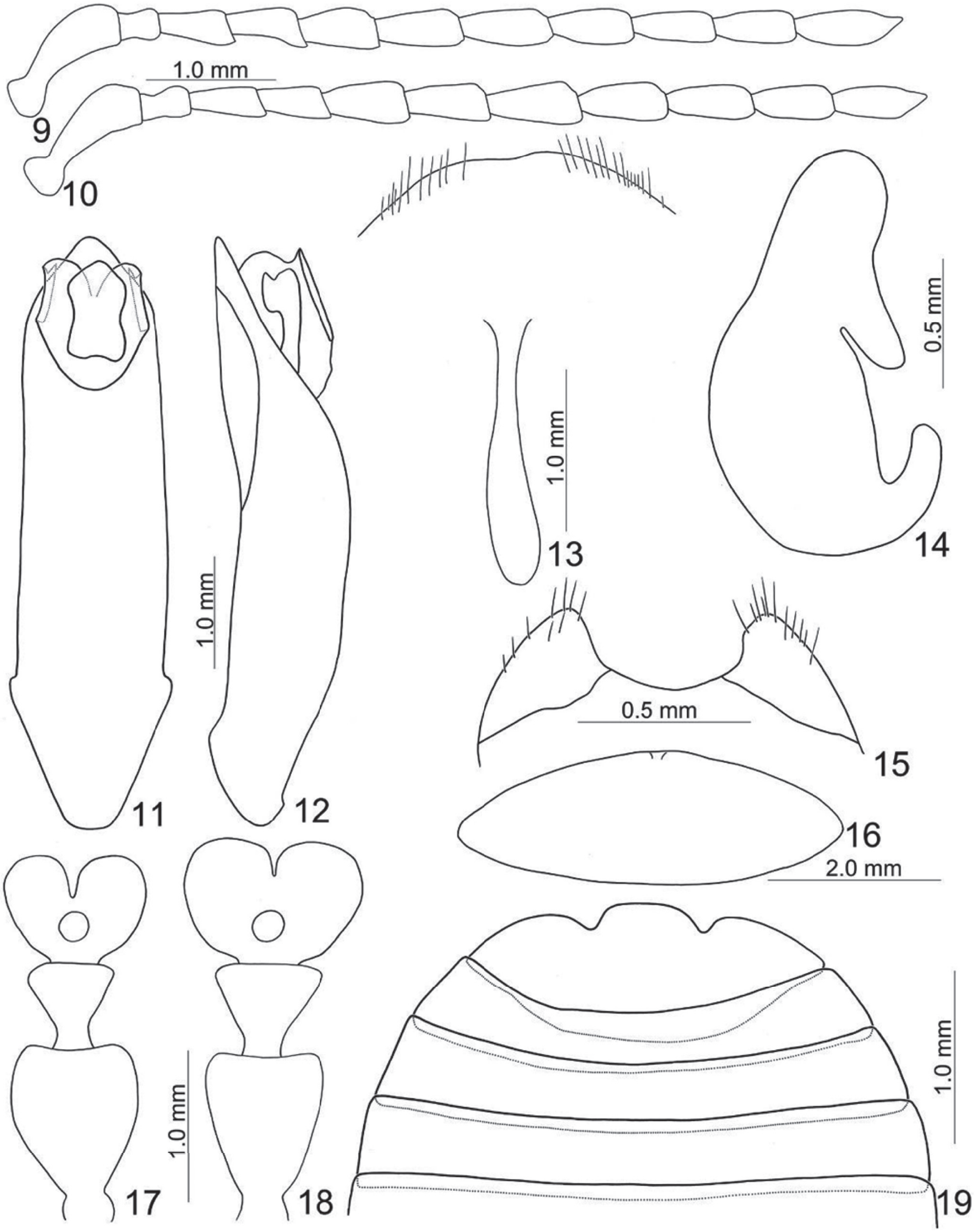
Distribution. China, Indonesia, Laos, Myanmar, Thailand, Vietnam.



Figs. 1–2. Diagnostic characters of pronotum and thoracic ventrites. 1. Pronotum, *Podontia dalmani*, AAL: longitudinal groove behind in appendix, AL: anterolateral area, CL: central line, LAL: longitudinal groove, LG: basal longitudinal groove, PG: posterior groove, TAL: transverse groove; 2. Thoracic ventrites, *P. lutea*, a: prosternum, b: mesoventrite, c: metaventrite, d: anterior coxa, e: middle coxa.

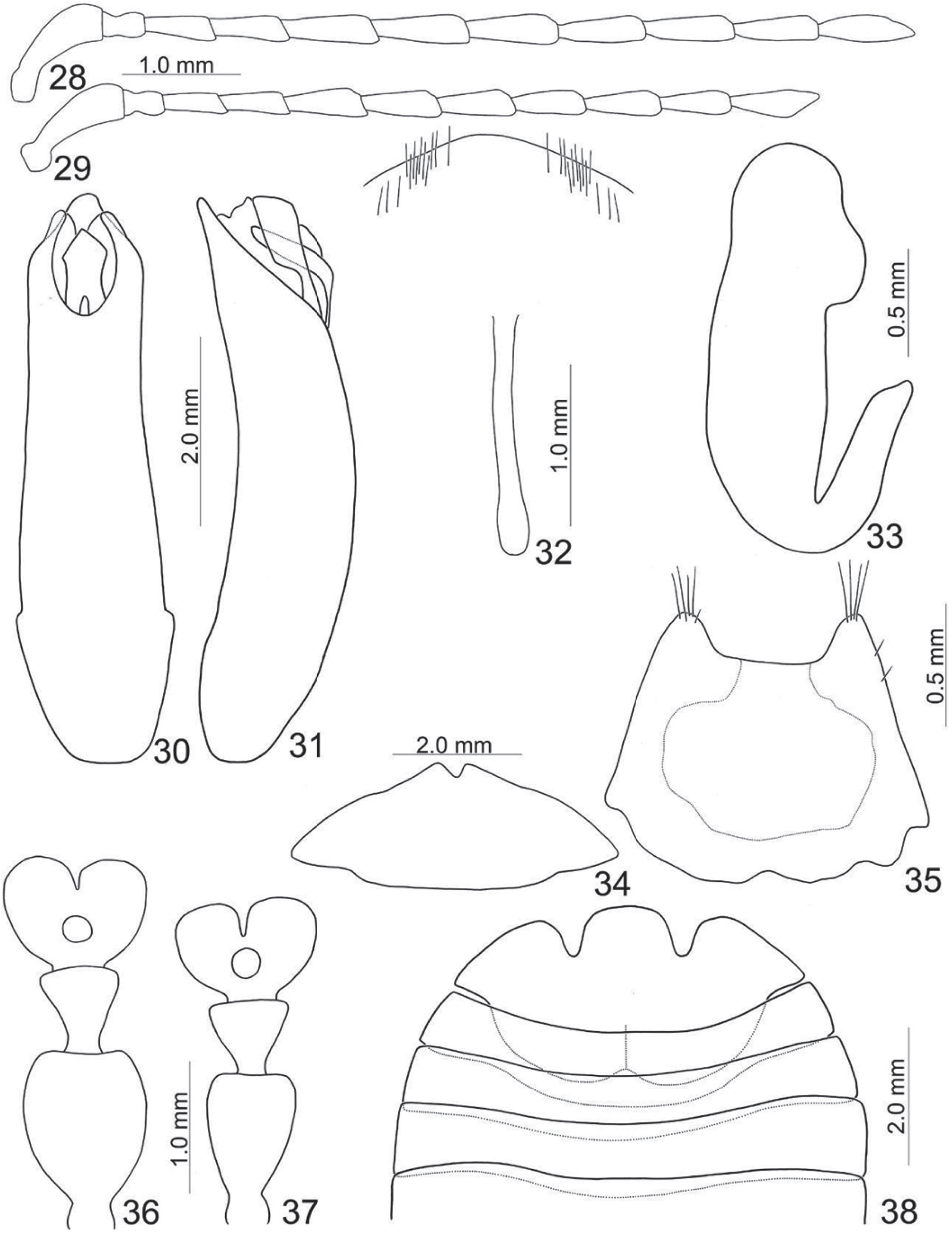


Figs. 3–8. Habitus of adult *Podontia* species. 3. *P. lutea,* male, dorsal view; 4. Ditto, ventral view; 5. Ditto, lateral view; 6. *P. dalmani*, female, dorsal; 7. Ditto, ventral view; 8. Ditto, lateral view.



Figs. 9–19. Diagnostic characters of *Podontia lutea.* 9. Antenna, male; 10. Antenna, female; 11. Penis, dorsal view; 12. Penis, lateral view; 13. Ventrite VIII, female; 14. Spermatheca; 15. Gonocoxae; 16. Ventrite V, female; 17. Tarsomeres I–III, male; 18. Tarsomeres I–III, female; 19. Ventrite I–V, male.

Figs. 20–27. Life stages on *Podontia lutea.* 20. Adult hiding under young shoots of host plants; 21. Egg mass; 22. First-instar larva; 23. Second-instar larva; 24. Fourth-instar larva; 25. Fourth-instar larva after shedding fecal coat and preparing to crawl to soil for pupation; 26. A pupa inside earth cocoon; 27. Empty earth cocoon with round opening.



Figs. 28–38. Diagnostic characters of *Podontia dalmani*. 28. Antenna, male; 29. Antenna, female; 30. Penis, dorsal view; 31. Penis, lateral view; 32. Ventrite VIII, female; 33. Spermatheca; 34. Ventrite V, female; 35. Gonocoxae; 36. Tarsomeres I–III, male; 37. Tarsomeres I–III, female; 38. Ventrite I–V, male.

CONCLUSION

This study confirms that more genitalic characters can be used for species identities besides the penis than previously described, including gonocoxae, spermathecal, female abdominal ventrite VIII, and abdominal ventrites II–V in both sexes. In addition, some features of genitalic characters are unique, such as presence of three endophallic sclerites at the ostium of the penis, almost membranous abdominal ventrite VIII in females except speculum, with long setae at sides near apical margin, and spermathecae with inseparable receptacle, pump, and distal spermathecal duct. They should be investigated further to determine if they are of diagnostic value in allied genera.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Taiwan Chrysomelid Research Team for collecting materials, including Hsing-Tzung Cheng, Yi-Ting Chung, and Mei-Hua Tsou; for taking photographs of specimens and live individuals in the field, including Hsing-Tzung Cheng, Chi-Lung Lee, Mei-Hua Tsou, and Hseuh Lee. We thank Jan Bezděk and Yongying Ruan for providing valuable literature. We especially thank Chang Chin Chen for assisting our study in various ways. We thank Chris Carlton for reading the draft and editing for American English style. This study was supported by the Ministry of Science and Technology MOST 109-2313-B-055-003.

REFERENCES

Allard, E. 1891. Collection d'insectes formée dans l'Indo-chine par M. Pavie consul de France aul Cambodge. Coléoptères. Phytophages. Nouv. Arch. Mus. Paris, ser. 3:229–234. (in French)

Baly, J. S. 1865. Descriptions of new genera and species of Galerucidae. Ann. Mag. Nat. Hist, ser. (3) 16:247–255.

Bezděk, J. 2012. Taxonomic and faunistic notes on Oriental and Palaearctic Galerucinae and Cryptocephalinae (Coleoptera: Chrysomelidae). Genus 23:375–418.

Chapuis, F. 1875. Famille des Phytophages. Histoire Naturelle des Insects. Genera des Coléoptères ou Exposé Méthodique et Critique de Tous les Genres Proposes Jusqu'ici Dans Cet Ordre D'insectes. Tome onzième. Librairie encyclopédique de Roret. Paris, France. 420 pp. (in French)

Chen, S. H. 1933. Study of Chinese Halticinae beetles with descriptions of some exotic new species. Sinensia 3:211–254.

Chen, S. H. 1934a. Revision of the Halticinae (Col. Chrysomelidae) of Yunnan and Tonkin. Sinensia 5:225–416.

Chen, S. H. 1934b. Some species of Helticinae from Canton. Peking Nat. Hist. Bull. 8:43–59.

Chen, S. H. 1939. Flea beetles collected at Kwangsi. Sinensia 10:20–55.

Chûjô, M. 1935. Studies on the Chrysomelidae in the Japanese empire (VIII). Subfamily Halticinae (3). Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 25:459–476.

Chûjô, M. 1963. Chrysomelid-beetles from Formosa, preserved in the Hungarian Natural History Museum, Budapest. Ann. Hist.-Nat. Mus. Natl. Hung. 55:379–402.

Dalman, J. W. 1824. Ephemerides Entomologicae. I. Typus P. A. Nordstedt. Holmiae. 36 pp.

Furth, D. G. 1998. New world *Blepharida* Chevrolat 1836 (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). Mem. Entomol. Soc. Washington 21:1–109.

Furth, D. G. 1999. Searching for sumacs and flea beetles: From African poison arrows to Mexican poison ivy. Entomol. News 110:183.

Furth, D. G. and J. E. Lee. 2000. Similarity of the *Blepharida*-group genera using larval and adult characters (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). J. New York Entomol. Soc. 108:26–51. doi:10.1664/0028-7199(2000)108[0026:SOTBGG]2.0.CO;2

Gemminger, M. and E. von Harold. 1876. Catalogus Coleopterorum hucusque descriptorum synonymicus et systematicus. Tom XII. Chrysomelidae (Pars II.). Languriidae, Erotylidae, Endomychidae, Coccinellidae, Corylophidae, Platypsyllidae. S. T. Ackermann. Monachii. p.3479–3822.

Gressitt, J. L. and S. Kimoto. 1963. The Chrysomelidae (Coleopt.) of China and Korea. Part 2. Pac. Ins. Mon. 1B:301–1026.

Gröndal. 1808. [new taxa]. p.288. *in*: Synonymia Insectorum, oder: Versuch einer Synonymie aller bisher bekannten Insekten; nach Fabricii Systema Eleutheratorum ect. Geordnet. 1 Eleutherata oder Käfer. 2. Spercheus bis Cryptocephalus. (Schönherr, C., ed.) Marquard. Stockholm, Sweden. 424 pp.

Heikertinger, F. 1924. Die Halticinen genera der Palaeraktis und Nearktis. Bestimmungstabellen. (Monographie der palaearktischen Halticinen: Systematischer Teil.-Zweites Stück.). Kol. Rundsch. 11:25–70. (in Germany)

Heikertinger, F. and E. Csiki. 1940. Chrysomelidae: Halticinae II. Coleopterorum Catalogus. Pars 169. W. Junk. s-Gravenhage, The Netherlands. p.337–635.

Hsu, K. T. 1934. Notes on the trip to Yenchow. Entomol. Phytopa. 2:276–283. (in Chinese)

Kimoto, S. 1970. Notes on the Chrysomelidae from Taiwan IV. Kontyû 38:205–221.

Kimoto, S. 1986. The Chrysomelidae (Insecta: Coleoptera) collected by the Nagoya University Scientific Expedition to Taiwan in 1984. Kurume Univ. J. 35:53–62.

Kimoto, S. 2000. Chrysomelidae (Coleoptera) of Thailand, Cambodia, Laos and Vietnam. VIII. Alticinae. Bull. Comp. Stud. Int. Cult. Soc. 26:103–299.

Kimoto, S. and Y. I. Chu. 1996. Systematic catalog of Chrysomelidae of Taiwan (Insecta: Coleoptera). Bull. Comp. Stud. Int. Cult. Soc. 16:1–152.

Kimoto, S. and H. Takizawa. 1997. Leaf Beetles (Chrysomelidae) of Taiwan. Tokai University Press. Tokyo, Japan. 581 pp.

Lee, C. F. and H. T. Cheng. 2007. The Chrysomelidae of Taiwan 1. Sishou-Hills Insect Observation Network. New Taipei, Taiwan. 199 pp. (in Chinese)

Lee, J. E. 1999. Taxonomic study of the larvae of the genus *Podontia* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) from Vietnam. Korean J. Environ. Biol. 17:365–369.

Lopatin, I. K. 2011. New genus and species of leaf-beetles (Coleoptera, Chrysoemlidae, Galerucinae) from China. Euroas. Entomol. J. 10:143–144. (in Russian)

Maulik, S. 1926. The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma. Coleoptera. Chrysomelidae (Chrysomelinae and Halticinae). Taylor and Francis. London, UK. 442 pp.

Medvedev, L. N. 1999. A revision of the group Blepharidini (Chrysomelidae: Alticinae) from the Oriental region. Russian Entomol. J. 8:175–184.

Miwa, Y. 1931. A Systematic Catalogue of Formosan Coleoptera. Department of Agriculture, Government Research Institute, Rep. No. 55. Taihoku, Formosa. 359 pp. (in Japanese)

Mohamedsaid, M. S. 1989. Flea beetles of the genus *Podontia* from Peninsular Malaysia (Chrysomelidae: Alticinae). Malay. Nat. J. 42:277–285.

Olivier, A. G. 1790. Encyclopedie Méthodique. Histoire Naturelle. Insectes. Tome cinquième. Panckoucke. Paris, France. 793 pp. (in French)

Olivier, A. G. 1807. Entomologie, ou histoire naturelle des insectes, avec leurs caractères génériques et spécifiques, leur description, leur synonymie et leur figure enluminée. Coléoptères. Tome ciquième. Dersay. Paris, France. 612 pp. (in French)

Prathapan, K. D. and C. S. Chaboo. 2011. Biology of *Blepharida*-group flea beetles with first notes on natural history of *Podontia congregata* Baly 1865, an endemic flea beetle from southern India (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Alticini). ZooKeys 157:95–130. doi:10.3897/zookeys.157.1472

Reid, C. A. M. 1997. Chrysomelidae from Kalimantan (Borneo) in the Museum of Zoology, Bogor, Indonesia. Serangga 2:29–47.

Scherer, G. 1969. Die Alticinae des indischen Subkontinentes (Coleoptera-Chrysomelidae). Pacif. Ins. Mon. 22:1–251. (in Germany)

Takizawa, H. 1978. Notes on Taiwanese chrysomelid larvae, V. Entomol. Rev. Jpn. 31:75–84.

Takizawa, H., S. Nakamura, and K. Kojima. 1995. The Taiwanese chrysomelid beetles preserved in Hiwa Museum for Natural History (Chrysomelidae: Coleoptera). Misc. Rep. Hiwa Mus. Nat. Hist. 33:1–16. (in Japanese)

大黃葉蚤 [*Podontia lutea* (Olivier, 1790)] 和褐帶凹緣葉蚤 [*P. dalmani* Baly, 1865] 的重新描述與大黃葉蚤的生物學注解 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族)

李奇峰 [1,*]　余素芳 [2]

摘要

李奇峰、余素芳。2021。大黃葉蚤 [*Podontia lutea* (Olivier, 1790)] 和褐帶凹緣葉蚤 [*P. dalmani* Baly, 1865] 的重新描述與大黃葉蚤的生物學注解 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族)。台灣農業研究 70(3):157–169。

大黃葉蚤 (*Podontia lutea*) 是全世界最大型的葉蚤；除了雄性生殖器，還針對雌蟲生殖突基節、雌蟲受精囊、雙性的第二至第五腹節及雌蟲的第八腹節腹板加以描繪；並藉由跟另外一個廣泛分布種褐帶凹緣葉蚤 (*P. dalmani*) 相互比對，證明這些特徵有診斷價值；並對此種生物學包括幼蟲及成蟲的取食行為、寄主植物及生活史提供更詳細的資料。

關鍵詞：金花蟲、分類學、漆樹科、木蠟樹、野漆樹。

投稿日期：2021 年 4 月 14 日；接受日期：2021 年 5 月 24 日。

* 通訊作者：chifeng@tari.gov.tw

1 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

2 北投區新民路 62 巷 1 號 4 樓公民科學家。台灣 台北市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(3):170–181 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202109_70(3).0002

研究報告

水稻「台農 82 號」誘變系與混系栽培下的稻熱病抗病性及產量表現之研究

廖大經 [1]　吳永培 [1,*]

摘要

廖大經、吳永培。2021。水稻「台農 82 號」誘變系與混系栽培下的稻熱病抗病性及產量表現之研究。台灣農業研究 70(3):170–181。

本研究於 2016 年以水稻品種「台農 82 號」及其誘變系為對象，比較「台農 82 號」與誘變系在 1 : 0、3 : 1、1 : 1、1 : 3 及 0 : 1 等 5 種不同比例混合栽培模式下，其植株稻熱病抗病性及產量之表現，以及模式預測能力之高低。試驗結果顯示，在第一期作混系組與對照組 (即單植「台農 82 號」) 比較，隨著混系比例增加，葉稻熱病罹病等級可由 8 級降低至 3 級，罹病度由 88.7% 降低至 28.7%，改善效率最高達 67.6%；穗稻熱病罹病等級由 6 級降低至 3 級，罹病度由 65.6% 降低至 40.0%，改善效率最高達 39.0%；產量由最低 2,379 kg ha^{-1} 增加至最高為 4,986 kg ha^{-1}，增產效率達 109.6%。惟第二期作對照組葉及穗稻熱病之罹病等級與罹病度，均較前期作減少約 50.0%，致使混系組與對照組在稻熱病防治效果及產量表現方面均無顯著差異。推測原因，可能是 2016 年 9、10 月份稻熱病發生時節連續有颱風侵襲，強風大雨不利於病原菌感染及散布所致。在混系栽培模式對於稻熱病罹病程度與產量之分析及預測能力方面，混系比例每增加 1 個單位，稻株葉稻熱病罹病反應表現為抗病之勝算將提高 3,766 倍，穗稻熱病則為 7 倍；葉及穗稻熱病罹病度分別減少 14.5% 與 5.1%；產量增加 18.7%。模式預測葉稻熱病罹病反應之正確度、特定度及敏感度均達到 80.0% 以上，穗稻熱病均達 73.0% 以上，但不足 80.0%；模式預測葉稻熱病罹病度可解釋 91.1% 總變異量，穗稻熱病僅為 41.6%，產量則為 57.5%。就整體而言，混系栽培模式對於抑制稻熱病發生及穩定產量具有非常顯著的效果，而模式預測能力則以葉稻熱病為優，穗稻熱病及產量的預測效果較差，顯示影響穗稻熱病及產量的因素可能較葉稻熱病為複雜。

關鍵詞：水稻、稻熱病、混系栽培、誘變系、邏輯斯回歸。

前言

台灣水稻周年栽培模式主要分為兩期作，以稉稻為主要栽培作物品種。過去研究指出，稉稻之稻熱病罹病等級與罹病度等嚴重程度明顯受期作效應的影響，並且認為第一期作是稻熱病的好發期節 (Chien 1978; Chen 1990; Chen *et al*. 2004)。據行政院農業委員會農業統計年報 (https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx) 顯示，2018 年第一期作台灣稻作收穫面積為 169,789 ha，其中稉稻收穫面積為 154,378 ha，占同期作收穫面積之 90.9% (Council of Agriculture 2018)。另據農糧署統計資料 (未發表)，同期作收穫面積最高之稉稻單一品種為 107,055 ha，占稉稻收穫面積之 69.3%。在單一品種收穫面積占比接近 7 成的情況下，若遭逢適於稻熱病發生的氣候環境，造成大流行的風險極高，也為糧食生產帶來嚴峻的危機。

在兼顧產量及食品安全的要求下，種植抗病品種被認為是最有效的方法 (Chen *et al*. 2004)。然而，抗病品種經常面臨開發育成時間過長及

投稿日期：2020 年 7 月 28 日；接受日期：2021 年 3 月 22 日。
* 通訊作者：wuypei@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

抗病年限過短等兩個難題，以傳統育種法育成抗病新品種平均約需 10 年左右，即使配合分子標誌輔助育種選拔，最快亦需 5–6 年的時間。另一方面，隨著抗病新品種命名推廣後栽培面積的擴增，因生理小種自然選汰壓力的增加，將刺激原有次要小種變成優勢小種，造成小種密度及侵染頻度大增，致使新品種抗病性於短時間內崩解 (Chien *et al*. 1989)。Chen *et al*. (2004) 研究指出，台灣於 1990 年後所育成之稉稻抗病品種，其抗病年限最高為 5 年，最低為 1 年，平均抗病年限約 1.8 年。為了延長抗病年限，除了栽培品種多樣化，控制單一品種栽培面積不致過度擴增以避免生理小種快速演化之外，將數個具不同抗性的抗病基因堆疊於同一栽培品種之中，基於抗病基因與病原菌致病性之專一性原則 (Flor 1955, 1971)，可擴大抗幅以避免抗病性過早失效。若以多親雜交後再回交聚合方式進行，除了在操作技術上有相當難度外，亦需耗費相當時日選拔後代，以剔除因雜交過程所帶來的遺傳累贅 (genetic drag) 現象。

以農藝性狀優良，惟抗病性不佳的栽培品種為輪迴親本，與帶有不同抗病基因的品種 (系) 為貢獻親本進行雜交後，再與輪迴親本連續回交數代，最後組成一系列農藝性狀與輪迴親本類似，然而各具有不同抗病基因的多系品種 (multiline variety)，是另一種針對病原菌生理小種多變性進行防治的育種方法 (Ou 1971)。多系品種在實務應用上，日本自 1986 年起即開始針對水稻品種「越光」進行抗稻熱病多系品種的選育開發研究，至 2007 年已育成各帶 *Pia*、*Pii*、*Pita-2*、*Piz*、*Pik*、*Pik-m*、*Piz-t* 及 *Pib* 等抗病基因共 11 個多系品種並推廣栽培。在多系品種抗病效果方面，以新潟縣為例，2004 年之前尚未推廣栽培時，感染穗稻熱病的水田面積約占 50–80%，2005 年推廣栽培後發病面積降至 10% 以下，市場上稻熱病防治藥劑之銷貨數量僅及 2004 年的 27% (Ishizaki 2010)，顯示多系品種防治稻熱病的效果相當卓著。

另一個值得考慮的方法，是利用化學藥劑疊氮化鈉 (sodium azide; SA) 進行誘變育種以擴大遺傳變異，其優點是毒性較低，操作安全，使用量少而育種效率高 (Chern & Huang 1984)。由於疊氮化鈉係造成基因體 (genome) 的點突變 (point mutation) (Al-Qurainy & Khan 2009)，因此適於單一性狀或者主效基因之改良。所獲得之突變系經稻熱病病圃篩選及純化，可獲得一系列抗病性來源不同的近同源系。將這些近同源系以一定比例混合組成混系栽培系統，一方面能降低原有致病性高之優勢小種的適應存活能力，同時阻礙病原菌在田間的散布 (Ou 1971)，可減緩病勢發展及穩定產量 (Chiu & Teng 1976)。

「台農 82 號」為產量穩定、低蛋白質、米飯食味佳的優良稉型水稻品種，惟其對於稻熱病抗病性較弱。本研究以親本「台農 82 號」及對稻熱病具抗性之誘變系為對象，探討親本與誘變系以不同混合比例組成之混系栽培模式，對於植株抗病性、產量及預測抗病效果的影響，提供解決抗病育種年限過長及有效抗病年限過短問題的參考作法之一。

材料與方法

參試材料、田區設計及栽培管理

2016 年第一及第二期作於行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所 (以下簡稱本分所) 水田試驗田區 (經度 120°28’29’’E，緯度 23°29’66’’N，海拔 49 m)，選取對葉稻熱病罹病反應為抗級且株型一致優良之 5 個「台農 82 號」誘變系 WM1354、WM1363、WM1370、WM1372 及 WM1543 等重量混合做為參試材料 (簡稱混誘系)，混誘系與親本「台農 82 號」以種子混合重量不同比例做為混系處理方式種植，田區採完全逢機設計方式 (completely randomized design; CRD)，每處理種植 4 重複。另外，單獨種植以上 5 個誘變系做為驗證其抗病性之用，田區同樣採 CRD 設計，每誘變系種植 3 重複。為促進發病，除田區參試材料周圍遍植感病品種 ‘Lomello’ 做為感病源外，全期氮肥施用量為 320 kg ha^{-1}。施肥方式分為基肥、第 1 次追肥、第 2 次追肥及穗肥等 4 次，各次氮肥比例分別為 30、20、30 及 20%。灌溉水分管理方式為移植初期田區水深維持約 3–5 cm；最高分蘗期排乾

水分曬田；抽穗開花期至糊熟期維持 5–10 cm 深水灌溉；黃熟期維持水深 3 cm 輪灌至成熟期為止，收穫日前 1 wk 排乾水分以利機械採收。病蟲害管理除針對縱捲葉蟲及螟蟲等蟲害以培丹藥劑適度防治外，為避免干擾稻熱病發病，未針對白葉枯病及紋枯病進行藥劑防治。

混系處理方式

單植組 (簡稱 M0)：「台農 82 號」與混誘系種子混合比例為 1 : 0。

混系 1 (簡稱 M1)：「台農 82 號」與混誘系種子混合比例為 3 : 1。

混系 2 (簡稱 M2)：「台農 82 號」與混誘系種子混合比例為 1 : 1。

混系 3 (簡稱 M3)：「台農 82 號」與混誘系種子混合比例為 1 : 3。

混系 4 (簡稱 M4)：「台農 82 號」與混誘系種子混合比例為 0 : 1。

田區試驗設計及種植方式

田區試驗處理配置採完全逢機設計，每處理4重複，每重複多本植種植4行，每行25株，行株距 25 cm × 20 cm。

試驗調查方式

一般農藝性狀、產量構成要素及單位面積產量調查

於第一、二期作水稻成熟期進行農藝性狀、產量構成要素及單位面積產量調查，調查時間分別為 2016 年 6 月 27 日及 11 月 14 日。調查方式為每重複隨機選取 10 株調查株高及穗數，收穫時隨機割取 3 株調查產量構成要素，其餘稻株割取後脫粒乾燥至穀粒含水量 13% 時秤重求得單株穀粒重，再乘以 222,222 (每公頃行株距 30 cm × 15 cm 之總株數) 換算得單位面積產量。

稻熱病罹病等級及罹病度調查

本研究關於稻熱病抗病性高低的評估指標有2項，分別為罹病等級 (disease scale) 與罹病度 (disease severity; DS)。葉及穗稻熱病罹病等級調查，係參照國際水稻研究所 [International Rice Research Institute (IRRI) 2002] 制定之「水稻標準評估系統」(Standard Evaluation System for Rice; SES)，以目視方式調查，罹病等級評估標準及對應罹病反應如下：

1. 葉稻熱病罹病等級區分為 0–9 級：0 級，罹病反應為極抗 (high resistant; HR)，葉片無病斑；1 級，葉片有針尖大小點狀病斑，無產孢中心，罹病反應為極抗 (HR)；2 級，稻株下位葉片有直徑 1–2 mm 之小圓至微長灰色病斑，罹病反應為抗 (resistant; R)；3 級，病斑大小形狀與 2 級相同，但稻株上位葉片亦有顯著數量病斑，罹病反應為中抗 (medium resistant; MR)；4 級，葉片有直徑 3 mm 或較長之典型感病型病斑，病斑占葉面積 4% 以下，罹病反應為中抗 (MR)；5 級，葉片上典型之稻熱病病斑占葉面積之 4–10%，罹病反應為中感 (medium susceptible; MS)；6 級，葉片上典型之稻熱病病斑占葉面積之 11–25%，罹病反應為中感 (MS)；7 級，葉片上典型之稻熱病病斑占葉面積之26–50%，罹病反應為感 (susceptible; S)；8 級，葉片上典型之稻熱病病斑占葉面積之 51–75%，並有許多葉片枯死，罹病反應為極感 (high susceptible; HS)；9 級，葉片面積 75% 以上被害，罹病反應為極感 (HS)。
2. 穗稻熱病罹病等級區分為 0–9 級：0 級，無被害穗，罹病反應為極抗 (HR)；1 級，罹病穗率 5% 以下，罹病反應為抗 (R)；3 級，罹病穗率 5–10%，罹病反應為中抗 (MR)；5 級，罹病穗率 11–25%，罹病反應為中感 (MS)；7 級，罹病穗率 26–50%，罹病反應為感 (S)；9 級，罹病穗率 50% 以上，罹病反應為極感 (HS)。

葉稻熱病及穗稻熱病之調查時期與數量，第一期作分別於 2016 年 4 月 25 日及同年度 6 月 20 日進行調查，每重複各調查 50 株及 10 株；第 2 期作分別自 2016 年 10 月 5 日及同年度 11 月 9 日進行調查，每重複各調查 10 株。平均罹病等級以全部調查植株罹病等級之中位數表示，罹病度計算公式如下 (IRRI 2002)：

$$DS\ (\%) = \frac{\sum sn_s}{N \times max(s)} \times 100 \qquad (1)$$

式 (1) 中，s 代表罹病等級，n_s 代表該罹病等級的株數，N 代表總調查株數，$max(s)$ 代表全部罹病等級區分之最高等級。

統計分析

本研究進行之統計分析工作皆以程式語言 “R” (3.6.3 版) 撰寫執行，分析株高、穗數、一穗穎花數、稔實率、千粒重、單位面積產量及罹病度等項目之處理效應是否顯著，係調用 “base” (R Core Team 2019) 套件之變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 進行。若處理效應呈現顯著，欲進行各處理間差異顯著性多重比較，則調用 “agricolae” (Felipe de Mendiburu 2020) 套件之最小顯著差異測驗 (Fisher’s least significant difference test; LSD) 進行分析。

為了評估及預測不同混系比例對於稻株罹病度、產量及罹病機率大小之影響，作為混系栽培防治效果的參考，本研究依資料屬性之不同，針對罹病度及產量等連續值調用 “base” 套件進行簡單線性回歸 (simple linear regression)。另以邏輯斯回歸 (logistic regression) 對於混系比例與稻株是否抗病之關聯性進行定量分析。為便於進行分析，首先將罹病反應簡化為抗病及感病兩類，以稻株罹病等級 5 級做為簡化罹病反應的分界，其中罹病等級小於 5 級者視為抗病，等於或大於 5 級者則視為感病。由稻株罹病資料中隨機選取 80% 的資料作為訓練資料，以罹病反應為因變數，混系比例為自變數，調用 “base” 套件進行邏輯斯回歸配適抗病機率模型。其餘 20% 的資料作為測驗資料套用機率模型建構其混淆矩陣 (confusion matrix) 以評估機率模型之預測效果，混淆矩陣如表 1 所示。

表 1 中，字母 R 代表抗病 (resistant)，S 代表感病 (susceptible)，a 代表模型正確預測為感病，即真陽性 (true positive; TP) 的個數；b 代表模型將實際感病預測為抗病，即偽陰性 (false negative; FN) 的個數；c 代表模型將實際抗病預測為感病，即偽陽性 (false positive; FP) 的個數；d 代表模型正確預測為抗病，即真陰性 (true negative; TN) 的個數。評估模型之預測效果指標如下：

表 1. 混淆矩陣。
Table 1. Confusion matrix[z].

	Predicted	
Observed	S	R
S	*a*	*b*
R	*c*	*d*

[z] S: susceptible; R: resistant.

1. 正確度 (accuracy)：模型對於資料的整體判別正確率。

$$\text{Accuracy}\ (\%) = \left(\frac{a+d}{a+b+c+d}\right) \times 100 \quad (2)$$

2. 敏感度 (sensitivity)：模型預測感病個數的正確率。

$$\text{Sensitivity}\ (\%) = \left(\frac{a}{a+c}\right) \times 100 \qquad (3)$$

3. 特定度 (specificity)：模型預測抗病個數的正確率。

$$\text{Specificity}\ (\%) = \left(\frac{d}{b+d}\right) \times 100 \qquad (4)$$

結果

誘變系對於稻熱病抗病性及產量表現

2016 年第一、二期作誘變系對於稻熱病之抗病性及產量表現，調查結果如表 2 所示。第一期作誘變系之葉稻熱病平均罹病等級呈現 2–3 級，罹病度之間達統計顯著差異 (P = 0.019)，最低為 WM1372 之 24.2%，最高為 WM1543 之 32.5%，其差幅為 8.3%。穗稻熱病平均罹病等級呈現 3–5 級，罹病度之間未達統計顯著差異 (P = 0.122)，可能是 WM1354 及 WM1372 重複間機差較大所致，其中以 WM1543 之 31.1% 為最低，WM1354 之 50.7%

為最高。單位面積產量之間未達統計顯著差異 (P = 0.064)，原因可能仍然是 WM1354 及 WM1363 重複間機差過大所造成，其中以 WM1543 之 6,892 kg ha^{-1} 為最高，最低為 WM1370 之 3,855 kg ha^{-1}。

第二期作誘變系之葉稻熱病平均罹病等級呈現 3–4 級，罹病度之間未達統計顯著差異 (P = 0.118)，罹病度最高為 WM1354 之 44.1%，最低為 WM1370 之 37.0%。穗稻熱病平均罹病等級除 WM1354 為 7 級外，其他表現介於 0–4 級之間，罹病度之間達統計顯著差異 (P < 0.001)，以 WM1543 之 15.2% 為最低，WM1354 之 66.3% 為最高，差幅為 51.1%。單位面積產量之間未達統計顯著差異 (P = 0.151)，其中以 WM1543 之 5,573 kg ha^{-1} 為最高，最低為 WM1354 之 4,629 kg ha^{-1}。

混系處理對於稻熱病抗病效果及產量表現

2016 年第一、二期作混系處理對於稻熱病之抗病性及產量表現，調查結果如表 3 所示。第一期作在稻熱病防治表現方面，與單植組 M0 比較，隨著混系比例之增加，葉稻熱病罹病等級由最高 8 級可降低至 3 級，罹病度防治效果由 23.0% 可提高至 67.6%。穗稻熱病防治效果略低於葉稻熱病，罹病等級由最高 6 級可降至 3 級，罹病度防治效果由 33.5% 可提高至 39.0%。在產量表現方面，與單植組 M0 比較，混系組之增產效果由 72.8% 可提高至 109.6%。另以混系比例為自變數，分別與罹病度及產量為因變數，利用簡單線性回歸分析探討混系比例與罹病度及產量間的定量關係，配適求得回歸模型如下。

混系比例與葉稻熱病罹病度之回歸模型如式 (5)：

$$y_s = 84.76 - 57.84x_{mix} \quad (5)$$

式 (5) 中，y_s 代表罹病度 (%)，x_{mix} 代表混系比例，回歸模型顯著性測驗達統計顯著水準 (P < 0.001)，模型表示混系比例增加 1 個單位 (即 0.25)，罹病度即減少 14.46%。決定係數 R^2 = 0.911，表示模型可解釋 91.1% 的總變異量。缺適性檢定 (lack of fit test) 不顯著 (P = 0.1204)，顯示混系比例與罹病度之間呈線性關係。

混系比例與穗稻熱病罹病度之回歸模型如式 (6) ：

表 2.　「台農 82 號」誘變系之稻熱病抗病性及產量表現。

Table 2.　The performance of grain yield and blast resistance on ‘Tainung 82’ mutant lines.

Line	Leaf blast		Panicle blast		Grain yield (kg ha^{-1})
	Disease scale	Disease severity (%)	Disease scale	Disease severity (%)	
1st cropping season					
WM1354	2	25.0 ± 2.38 b^z	5	50.7 ± 10.68	6,707 ± 1,951.2
WM1363	3	31.0 ± 5.45 a	5	40.4 ± 4.21	6,475 ± 1,403.1
WM1370	2	25.5 ± 2.14 b	4	43.3 ± 6.19	3,855 ± 643.0
WM1372	2	24.2 ± 1.35 b	5	38.1 ± 11.88	5,975 ± 964.3
WM1543	3	32.5 ± 1.64 a	3	31.1 ± 3.85	6,892 ± 417.6
2nd cropping season					
WM1354	4	44.1 ± 3.39	7	66.3 ± 9.45 a	4,629 ± 490.7
WM1363	4	41.5 ± 1.70	3	25.6 ± 5.77 bc	5,499 ± 730.7
WM1370	3	37.0 ± 2.80	3	34.1 ± 7.80 b	5,268 ± 87.2
WM1372	3	37.4 ± 3.39	4	38.8 ± 8.41 b	5,303 ± 399.9
WM1543	4	39.3 ± 4.49	0	15.2 ± 5.48 c	5,573 ± 175.2

[z] Means within each the column followed by the different letter(s) are significantly different at P < 0.05 by Fisher’s protected least significant difference (LSD) test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior analysis.

表 3. 混系處理之稻熱病抗病性及產量表現。

Table 3. The performance of grain yield and blast resistance on the treatment of mixed-line cultivation models.

	Leaf blast			Panicle blast				
Mixed line	Disease scale	Disease severity (%)	Control efficiency (%)	Disease scale	Disease severity (%)	Control efficiency (%)	Grain yield (kg ha^{-1})	Yield efficiency (%)
1st cropping season								
M0	8	88.7 ± 3.05 a[z]	-	6	65.6 ± 9.85 a	-	2,379 ± 261.8 c	-
M1	6	68.3 ± 9.71 b	23.0	3	43.6 ± 11.45 b	33.5	4,112 ± 588.0 b	72.8
M2	5	49.8 ± 6.66 c	43.9	5	47.8 ± 2.22 b	27.1	4,986 ± 559.1 a	109.6
M3	4	43.7 ± 4.67 c	50.7	3	43.9 ± 6.38 b	33.1	4,721 ± 441.7 ab	98.4
M4	3	28.7 ± 4.26 d	67.6	3	40.0 ± 3.14 b	39.0	4,951 ± 623.7 a	108.1
2nd cropping season								
M0	4	43.1 ± 2.46	-	3	35.8 ± 6.50	-	5,344 ± 346.6	-
M1	4	42.2 ± 4.16	2.1	3	23.1 ± 11.74	35.5	5,109 ± 656.8	-4.4
M2	4	41.9 ± 3.99	2.8	3	24.7 ± 9.57	31.0	5,341 ± 783.0	-0.1
M3	4	41.1 ± 3.95	4.6	3	32.5 ± 15.19	9.2	5,353 ± 479.2	0.2
M4	4	40.3 ± 3.67	6.5	3	37.5 ± 13.53	-4.7	5,633 ± 379.0	5.4

[z] Means within each the column followed by the different letter(s) are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's protected least significant difference (LSD) test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior analysis.

$$y_s = 58.33 - 20.33x_{mix} \quad (6)$$

式 (6) 回歸模型顯著性測驗達統計顯著水準 ($P = 0.002$)，模型表示混系比例增加 1 個單位 (即 0.25)，罹病度即減少 5.08%。決定係數 $R^2 = 0.416$，表示模型可解釋 41.6% 的總變異量。缺適性檢定為顯著 ($P = 0.0413$)，顯示混系比例與罹病度之間可能呈非線性關係。

混系比例與單位面積產量之回歸模型如式 (7)：

$$y_y = 3{,}079.5 + 2{,}300.9x_{mix} \quad (7)$$

式 (7) 中，y_y 代表單位面積產量 (kg ha^{-1})，x_{mix} 代表混系比例，回歸模型顯著性測驗達統計顯著水準 ($P < 0.001$)，模型表示混系比例增加 1 個單位 (即 0.25)，產量即增加 18.68%。決定係數 $R^2 = 0.575$，表示模型可解釋 57.5% 的總變異量。缺適性檢定為極顯著 ($P = 0.0028$)，顯示混系比例與產量之間呈非線性關係。

第二期作單植組 M0 與混系組 M1–M4 之葉稻熱病罹病等級均為 4 級，各罹病度之間無顯著差異 ($P = 0.852$)，防治效果則隨著混系比例增加而微幅提高，由混系比例最低 M1 之 2.1% 提高至 M4 之 6.5%。穗稻熱病罹病等級均為 3 級，各罹病度之間無顯著差異 ($P = 0.336$)，防治效果大小有隨著混系比例增加而下降的趨勢，最高為 M1 之 35.5%，最低為 M4 之 -4.7%。單位面積產量之間無顯著差異 ($P = 0.772$)，增產效果亦不明顯，以 M4 之 5.4% 最高，M1 及 M2 較單植組 M0 呈現微幅減產的情況。

誘變系之農藝性狀及產量構成要素

2016 年第一、二期作誘變系之農藝性狀及產量構成要素調查結果，如表 4 所示。第一期作在穗數及一穗穎花數方面均無顯著差異，其他如株高、稔實率及千粒重等呈顯著差異之項目。WM1363 分別在株高與稔實率兩項目中表現最高，分別為 119.3 cm 及 94.3%；而 WM1370 則表現最低，分別為 106.2 cm 及 71.9%。至於千粒重，則以 WM1370 之 29.3 g 為最高，WM1543 之 24.5 g 為最低。

第二期作在穗數及千粒重方面均無顯著差異，其他如株高、一穗穎花數及稔實率呈顯著差異之項目。WM1363 表現與第一期作相同，分別在株高與稔實率兩項目表現最高，分別為 106.8 cm 及 92.3%；而稔實率最低者同樣為 WM1370 之 70.4%。一穗穎花數則以 WM1354 最高為 122.6 粒，最低為 WM1363 之 100.6 粒。

表 4.　「台農 82 號」誘變系之農藝性狀及產量構成要素調查。

Table 4.　The investigation of agronomic traits and components of grain yield on ‘Tainung 82’ mutant lines.

Line	Plant height (cm)	Panicle number (no.)	Spikelet no. per panicle (no.)	Spikelet fertility (%)	1,000-grain weight (g)
1st cropping season					
WM1354	108.3 ± 10.90 bc[z]	12.0 ± 2.65	131.7 ± 31.98	85.7 ± 7.58 b	25.7 ± 1.06 bc
WM1363	119.3 ± 5.19 a	13.0 ± 3.32	109.3 ± 19.07	94.3 ± 2.24 a	26.8 ± 0.92 b
WM1370	106.2 ± 4.39 c	11.9 ± 2.89	121.0 ± 19.77	71.9 ± 17.99 c	29.3 ± 1.67 a
WM1372	107.3 ± 3.64 bc	11.1 ± 2.26	110.7 ± 17.10	92.7 ± 1.48 a	29.1 ± 0.77 a
WM1543	110.5 ± 4.21 b	13.7 ± 3.16	117.4 ± 31.32	90.8 ± 2.70 ab	24.5 ± 4.40 c
2nd cropping season					
WM1354	94.4 ± 3.93 c	8.9 ± 1.96	122.6 ± 8.11 a	87.5 ± 3.99 b	29.3 ± 0.98
WM1363	106.8 ± 4.94 a	11.1 ± 2.85	100.6 ± 9.76 c	92.3 ± 2.28 a	29.0 ± 0.97
WM1370	97.1 ± 3.33 b	10.7 ± 2.50	115.7 ± 12.97 ab	70.4 ± 8.95 c	30.0 ± 2.50
WM1372	98.8 ± 3.46 b	9.9 ± 2.09	112.2 ± 9.94 b	88.8 ± 5.36 ab	29.6 ± 0.91
WM1543	105.6 ± 3.43 a	10.3 ± 2.24	109.6 ± 8.81 bc	91.1 ± 2.68 ab	28.2 ± 0.48

[z] Means within each the column followed by the different letter(s) are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher’s protected least significant difference (LSD) test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior analysis.

混系處理之農藝性狀及產量構成要素

2016 年第一、二期作混系處理之農藝性狀及產量構成要素調查結果，如表 5 所示。第一期作在穗數及一穗穎花數方面均無顯著差異，其他如株高、稔實率及千粒重等呈顯著差異之項目，則一致以混系組 M4 為最高，對照組 M0 為最低，而 M1–M4 之間則大致隨著混系比例之增加而增加。第二期作在穗數及稔實率方面均無顯著差異，其他如株高、一穗穎花數及千粒重等呈顯著差異之項目。除了千粒重最高為 M4，最低為 M0 外，株高及一穗穎花數均以 M0 為最高，M1–M4 之間則無明顯差異。

混系處理與稻株罹病反應之回歸模型配適及評估

2016 年第一期作以混系比例與葉稻熱病罹病反應進行邏輯斯回歸，配適模型如式 (8) 所示。

$$\pi(x) = \frac{exp(-4.9598 + 8.2338x)}{1 + exp(-4.9598 + 8.2338x)} \qquad (8)$$

式 (8) 中截距 α 與回歸係數 β 分別為 -4.9598 及 8.2338，並且均達到統計顯著水準。由於 β 為正值，顯示混系比例與抗病機率呈正相關，若混系比例增加 1 個單位，則稻株抗病之勝算 (即同組資料中抗病與罹病機率的比例值) 將提高 $exp(8.2338)$ = 3,766.12 倍。當混系比例 x 為 0、0.25、0.50、0.75 及 1.00 時，則稻株表現為抗病的機率 $\pi(x)$ 分別為 0.0070、0.0521、0.3009、0.7713 及 0.9635。回歸模型對於測驗資料的預測評估結果如表 6 所示，測驗資料的正確度 84.88% 及特定度 85.88% 均高於訓練資料，僅敏感度 84.17% 略低於訓練資料。

混系比例與穗稻熱病罹病反應進行邏輯斯回歸，配適所得模型如式 (9) 所示。

$$\pi(x) = \frac{exp(-1.1210 + 1.9518x)}{1 + exp(-1.1210 + 1.9518x)} \qquad (9)$$

式 (9) 之截距 α 及回歸係數 β 分別為 -1.1210 及 1.9518，同時均達到統計顯著水準。由於 β 為正值，顯示混系比例與抗病機率呈正相關，若混系比例增加 1 個單位，則稻株抗病的勝算提高 $exp(1.9518)$ = 7.04 倍。當混系比例 x 為 0、0.25、0.50、0.75 及 1.00 時，稻株表現為抗病的機率 $\pi(x)$ 分別為 0.2458、0.3468、0.4638、0.5849 及 0.6965。回歸模型對於測驗資料的預

表 5.　混系處理之農藝性狀及產量構成要素調查。

Table 5. The investigation of agronomic traits and components of grain yield on the treatment of mixed-line cultivation models.

Mixed line	Plant height (cm)	Panicle number (no.)	Spikelet no. per panicle (no.)	Spikelet fertility (%)	1,000-grain weight (g)
1st cropping season					
M0	88.9 ± 4.59 d[z]	13.2 ± 4.26	89.1 ± 24.00	67.3 ± 6.15 b	22.1 ± 1.21 c
M1	97.1 ± 7.10 bc	12.3 ± 3.84	87.4 ± 12.23	69.3 ± 10.77 b	24.3 ± 2.71 b
M2	96.5 ± 7.24 c	12.4 ± 3.92	85.9 ± 11.40	78.7 ± 6.57 a	25.2 ± 2.93 b
M3	99.4 ± 7.44 b	13.3 ± 2.00	83.8 ± 14.60	74.4 ± 8.31 ab	25.8 ± 2.02 ab
M4	105.7 ± 7.33 a	13.3 ± 4.05	86.2 ± 9.24	80.4 ± 14.06 a	27.2 ± 2.01 a
2nd cropping season					
M0	108.0 ± 3.69 a	13.1 ± 1.83	107.4 ± 11.44 a	85.2 ± 6.94	25.0 ± 1.35 d
M1	103.3 ± 4.80 b	11.7 ± 2.27	89.0 ± 18.19 b	85.9 ± 4.94	26.1 ± 1.00 c
M2	103.5 ± 4.11 b	12.2 ± 1.85	94.4 ± 10.88 b	84.0 ± 4.06	27.3 ± 1.78 b
M3	103.9 ± 6.35 b	12.8 ± 2.49	87.4 ± 9.07 b	85.3 ± 6.26	28.3 ± 1.21 ab
M4	102.8 ± 5.79 b	13.0 ± 1.95	84.9 ± 10.29 b	84.6 ± 7.32	29.1 ± 0.83 a

[z] Means within each the column followed by the different letter(s) are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's protected least significant difference (LSD) test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior analysis.

表 6. 混系比例與葉稻熱病罹病反應回歸模型之混淆矩陣及預測結果。

Table 6. The confusion matrix and the results of prediction on the regression models of the ratio of mixed-line cultivation models and the disease scale of leaf blast[z].

Training sample			Test sample		
	Predicted			Predicted	
Observed	S	R	Observed	S	R
S	409	56	S	101	12
R	71	259	R	19	73
Accuracy (%)	84.03			84.88	
Sensitivity (%)	85.21			84.17	
Specificity (%)	82.22			85.88	

[z] S: susceptible; R: resistant.

測評估表現如表 7 所示，雖然測驗資料之正確度 75.00%、敏感度 76.19% 及特定度 73.33% 等指標均優於訓練資料，但是整體預測表現卻較葉稻熱病模型為差。

討論

2016 年第一期作於本分所之試驗結果顯示，「台農 82 號」誘變系混系栽培對於抑制稻熱病及穩定產量方面具有顯著效果。混系組與對照組「台農 82 號」比較，葉稻熱病罹病等級降幅最高可達 5 級，罹病度降幅最高達 60.0%；穗稻熱病抑制效果雖較葉稻熱病低，然而罹病等級降幅最高亦可達 3 級，罹病度降幅最高達 25.6%。在產量表現方面，因稻熱病受抑制而造成增產效果，最高可達 109.6%。混系比例與稻株罹病反應的邏輯斯回歸模型亦顯示，混系比例增加 1 個單位，稻株呈抗病反應的勝算提高近 3,766 倍，即使是混系比例最低之 M1 稻株，其抗病機率是對照組 M0 的 7.4 倍。第二期作由於對照組之稻熱病罹病等級及罹病度均較前期作減少約 50.0%，而與混系組接近，因此混系組與對照組在稻熱病抑制及產量表現方面無明顯差異。造成對照組在第二期作發病程度較低之原因，可由兩期作之致病優勢生理小種及氣象條件之差異性分別探討。根據「台農 82 號」於 2016–2019 年在本分所旱田式病圃中進行稻熱病檢定結果顯示 (未發表)，除 2017 年兩期作均表現為中感級外，其他年度兩期作均表現為感級或極感級。由於旱田式病圃屬於較為封閉之場域，受到外界環境變化的影響較少，因此推測在兩期作感染「台農 82 號」的優勢生理小種應無太大變化。在氣象條件方面，影響稻熱病發生的關鍵氣象因子主要是相對濕度與降水日數，若降水日數較多，會增加罹病反應嚴重程度 (Chen *et al.*

表 7. 混系比例與穗稻熱病罹病反應回歸模型之混淆矩陣及預測結果。

Table 7. The confusion matrix and the results of prediction on the regression models of the ratio of mixed-line cultivations and the disease scale of panicle blast[z].

Training sample			Test sample		
	Predicted			Predicted	
Observed	S	R	Observed	S	R
S	62	25	S	16	4
R	37	40	R	5	11
Accuracy (%)	62.20			75.00	
Sensitivity (%)	62.63			76.19	
Specificity (%)	61.54			73.33	

[z] S: susceptible; R: resistant.

2004)。根據交通部中央氣象局網站氣象資料顯示 (Central Weather Bureau 2020)，2016 年嘉義市第一、二期作稻熱病發生期節 (第一期作：5、6 月份，第二期作：9、10 月份) 之相對濕度各為 82.0% 及 81.0%，降水量各為 227 mm 及 662 mm，降水日數各為 20 d 及 23 d。第二期作之降水量及降水日數較多，主要為 2016 年 9、10 月曾針對第 14 號強烈颱風莫蘭蒂、第 16 號中度颱風馬勒卡、第 17 號中度颱風梅姬及第 19 號輕度颱風艾利等 4 個颱風發布颱風警報，其中強烈颱風莫蘭蒂及中度颱風梅姬登陸台灣本島。颱風帶來強風造成空氣中病原菌孢子數降低 (Suzuki 1974)，而附著於葉片上的孢子則被強風吹落 (Suzuki 1974) 及大雨沖刷流失 (Asai *et al*. 1967; Chien *et al*. 1984)，均不利於稻熱病之發生與傳播。任何針對稻熱病發生的防治措施，其主要目的均在於確保穩定的產量。混系栽培因涉及品系製種及混合等前置作業，故種植成本勢必高於單一品種栽培方式。因此，就混系比例對於病害防治與增產效果的評估，是攸關混系栽培能否實用的關鍵。表 3 中第一期作除對照組 M0 之外，葉及穗稻熱病抗病表現皆以混系組 M4 為最佳，而 M2 雖然在穗稻熱病抗病表現最差，但是 M2、M3 及 M4 之產量表現無顯著差異，並且以 M2 產量最高，M4 則略低於 M2 居次。比較 M2 及 M4 的產量構成要素資料 (表 5)，發現 M2 僅在千粒重一項顯著低於 M4，其他如穗數、一穗粒數及稔實率雖略低於 M4，但均未達顯著差異水準。在葉稻熱病階段主要影響穗數，此階段 M2 之罹病反應及罹病度雖較 M4 嚴重，然而並未影響穗數表現，顯示 M2 罹患葉稻熱病之稻株似乎有相當之恢復能力。稔實率及千粒重則主要受穗稻熱病之影響，若於穀粒充實期之前即感染穗稻熱病，造成稔實率下降，對於產量影響較大；反之，穀粒充實期後才罹患穗稻熱病者，主要影響千粒重，但造成產量損失程度較少 (Tsai 1988)。由於本研究對照組與混系組調查穗稻熱病日期於 2016 年 6 月 20 日至同年 6 月 24 日完成，無抽穗期不一致的現象，因此就產量構成要素調查結果推論，M2 可能於穀粒充實期開始後才受到穗稻熱病感染。

混系栽培模型除了可明確及合理描述抑制病害發生的成效與原因之外，對於抑制病害發生程度與穩定產量效果的預測能力亦值得探討。本研究就資料型態之類型，對於模型以兩種統計分析方式來評估其預測能力，罹病度與產量資料使用線性回歸分析；罹病反應資料則使用邏輯斯回歸分析。就葉稻熱病罹病度而言，線性回歸模式的決定係數 R^2 為 91.1%，代表混系比例可解釋模型 91.1% 的變異，缺適性檢定顯示混系比例與罹病度呈線性關係，因此模式應有相當優良的預測效果。另一方面，穗稻熱病罹病度與產量之 R^2 則各僅有 41.6% 與 57.5%，其預測效果不甚理想，缺適性檢定顯示模式非線性關係，表示模式中除了混系比例外可能尚有其他具部分影響力的因子。事實上，若在模式中各增加一項混系比例之 2 次式，則穗稻熱病罹病度之 R^2 由 41.6% 略提高至 50.7%，而產量之 R^2 由 57.5% 大幅提高至 78.8%，表示影響穗稻熱病罹病度變化的因子則較為複雜，致使模式 R^2 改善程度有限，而混系比例與產量之間有較明顯的二次關係。

至於模式對於稻熱病罹病反應之預測，本研究以混系比例影響稻株抗病反應之機率大小來表示。混系比例每增加 1 單位，稻株對於葉稻熱病表現抗病反應的勝算提高約 3,766 倍，遠高於穗稻熱病的約 7 倍；評估模式預測效果的指標：正確度、特定度及敏感度，同樣以葉稻熱病的表現優於穗稻熱病。綜合以上預測結果說明，影響植株罹患穗稻熱病的因素較葉稻熱病為複雜，致使模式對於穗稻熱病的預測表現不佳，而穗稻熱病造成產量損失的影響更為直接。因此，未來對於穗稻熱病的流行病學，必須作更為深入調查與完整資料蒐集，以提高模式預測能力及防治效果。

誌謝

本研究承行政院農業委員會科技計畫 105 農科 -10.5.4- 農 -C2 經費挹注，試驗調查及資料整理承本分所農藝系羅俊欽及賴佳鴻等同仁協助，特此誌謝。

引用文獻

Al-Qurainy, F. and S. Khan. 2009. Mutagenic effects of

sodium azide and its application in crop improvement. World Appl. Sci. J. 6:1589–1601.

Asai, G. N., M. W. Jones, and F. G. Rorie. 1967. Influence of certain environmental factors in the field on infection of rice by *Piricularia oryzae*. Phytopathology 57:237–241.

Central Weather Bureau. 2020. CWB Observation Data Inquire System. https://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp (visit on 01/31/2021)

Chen, L. C. 1990. Reaction of rice varieties and selections to blast in the uniform blast nurseries. J. Agric. Res. China. 39:303–314. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.199012.0006

Chen, L. C., Y. S. Chen, and Y. H. Cheng. 2004. Test of rice varieties and strains resistant to rice blast in blast nurseries during 1990–2002. J. Agric. Res. China. 53:269–283. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.200412.0006

Chern, C. G. and C. S. Huang. 1984. Mutagenic efficiency of sodium azide on rice variety ‘Tainung 67’. J. Agric. Res. China. 33:345–353. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.198412.0001

Chien, C. C. 1978. Levels of host resistance in relation to the incidence of rice blast. p.225–245. *in*: Disease and Insect Pests of Rice: Ecology and Epidemiology. (Chiu, R. J. ed.) Joint Commission on Rural Reconstruction Publ., Taipei, Taiwan. 331 pp. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., W. H. Tsai, Y. Z. Yang, and C. Liu. 1984. Studies on the epidemiology of rice blast disease in central areas of Taiwan. J. Agric. Res. China. 33:169–180. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.198406.0009

Chien, C. C., L. C. Hsieh, and Y. C. Chang. 1989. Studies on the break-down of resistance in rice cultivar ‘Tainung 70’ to rice blast. J. Agric. Res. China. 38:72–79. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.198903.0006

Chiu, S. M. and Y. C. Teng. 1976. Studies on disease resistance, yielding capacity and grain quality of blast resistant multiline and composite varieties of rice. J. Agric. Res. China. 25:249–258. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.197612.0001

Council of Agriculture. 2018. Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 356 pp. (in Chinese)

Felipe de Mendiburu. 2020. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-2. https://CRAN.R-project.org/package=agricolae (visit on 07/28/2020)

Flor, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust–Its genetics and other implications. Phytopathology 45:680–685.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9:275–296. doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001423

International Rice Research Institute. 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 56 pp.

Ishizaki, K. 2010. Breeding and practical application of ‘Koshihikari Niigata BL Series’ in Niigata Prefecture. Breeding Res. 12:160–164. (in Japanese)

Ou, S. H. 1971. A new approach to rice breeding for blast disease resistance. p.31–48. *in*: Rice Diseases. (Chiu, R. J., ed.) Joint Commission on Rural Reconstruction Publ., Taipei, Taiwan. 372 pp. (in Chinese)

R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org (visit on 07/28/2020)

Suzuki, H. 1974. Studies on the behavior of the rice blast fungus spore and the application for forecasting method of the rice blast disease. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 40:165–167. (in Japanese) doi:10.3186/jjphytopath.40.165

Tsai, W. H. 1988. Estimation of rice yield losses caused by panicle blast disease. J. Agric. Res. China. 37:86–90. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.198803.0009

Study on the Mixed-Line Cultivation Model of Rice Variety ‘Tainung 82’ Mutant Lines for Resistance of Blast and Grain Yield

Dah-Jing Liao[1] and Yong-Pei Wu[1,*]

Abstract

Liao, D. J. and Y. P. Wu. 2021. Study on the mixed-line cultivation model of rice variety ‘Tainung 82’ mutant lines for resistance of blast and grain yield. J. Taiwan Agric. Res. 70(3):170–181.

The materials used for this study were rice variety ‘Tainung 82’ and its mutantlines. All the lines were cultivated in 5 different ratios of mixed combinations, 1 : 0, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3 and 0 : 1 in the first cropping season of 2016. The goal of this study was to investigate blast resistance, grain yield and predictability under mixed-line cultivation models. The results revealed that when the ratio of mixed-line cultivation increased, as compared to the individual cultivation of ‘Tainung 82’, the disease scale of leaf blast decreased from level 8 to 3, disease severity decreased from 88.7% to 28.7%, and the highest efficiency of improvement had reached 67.6%. The disease scale of panicle blast decreased from level 6 to 3, disease severity decreased from 65.6% to 40.0%, and the highest efficiency of improvement had reached 39.0%. The grain yield increased from 2,379 kg ha^{-1} to 4,986 kg ha^{-1}, and the efficiency of improvement was 109.6%. However, the disease scale and severity of both leaf and panicle blast in the second cropping season decreased about 50.0% when compared to those of the first cropping season. As a result, there was no significant difference on the control effect between the mixed-line cultivation models and the control group, which could be due to typhoon during the experimental period. From September to October of 2016, there were several typhoons attacking Chiayi area, and strong wind and heavy rain decreased the spreading of the pathogen. As for the analysis and predictability for the disease scale of blast and grain yield under mixed-line cultivation models, the ratio of mixed line cultivation increased 1 unit (25.0%), the odds of resistance in the disease scale of leaf blast increased by 3,766-fold, the disease scale of leaf blast increased 7 times, the disease severity of leaf and panicle blast decreased by 14.5% and 5.1%, respectively, and grain yield increased by 18.7%. The accuracy, specificity and sensitivity of predictability for the disease scale of leaf blast under mixed-line cultivation models were greater than 80.0%, the disease scale of panicle blast ranged from 73.0 to 80.0%. The predictability for the disease severity of leaf and panicle blast would be explained by 91.1% and 41.6% of variance, respectively, and the grain yield would be explained by 57.5% of variance. Overall, the mixed-line cultivation models exhibited a great impact on the inhibition of blast and the control of rice blast and stability of grain yield. As for the predictability of mixed-line cultivation models, the predictability of leaf blast was superior, but not in the panicle blast and grain yield, indicating that factors that affect panicle blast and grain yield are more complicated than those of leaf blast.

Key words: Rice, Blast, Mixed-line cultivation, Mutant lines, Logistic regression.

Received: July 28, 2020; Accepted: March 22, 2021.
[*] Corresponding author, e-mail: wuypei@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellows, Agronomy Department, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(3):182–195 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202109_70(3).0003

研究報告

花椰菜雙單倍體誘變平台建立

夏奇鋕[1] 陳威臣[2] 許秀惠[3] 林楨祐[4] 曹進義[5] 林子凱[6,*]

摘要

夏奇鋕、陳威臣、許秀惠、林楨祐、曹進義、林子凱。2021。花椰菜雙單倍體誘變平台建立。台灣農業研究 70(3):182–195。

本研究採用雙單倍體 (doubled haploid; DH) 作為小孢子供體，於小孢子培養過程中施以誘變處理，建立花椰菜雙單倍體誘變平台。誘變處理包括以紫外光 (ultraviolet; UV) 處理 4 個不同結球天數花椰菜 DH 品系之小孢子，DH 品系源自「慶農 S-65」小孢子培養；以及利用 ethyl methanesulphonate (EMS) 處理上述 UV 試驗所得之小孢子胚，並將上述兩誘變處理所得 DH 植株種植於田間，觀察誘變株發育階段的變化。此外，又以 EMS 處理「慶農 S-65」花蕾並取其內小孢子進行培養，比較不同濃度處理對小孢子胚分化之影響。誘變結果顯示，以 UV 處理小孢子 10 s 及 20 s，4 個 DH 品系之胚分化率為其對照組的 23.9–65.1%，但 2 種光照時間處理的差異不顯著。接續觀察經 UV 處理之小孢子胚發芽率，結果顯示有不同程度之下降，為其對照組之 50.9–78.8%。DH32 之小孢子經 UV 處理後長出之胚，接續以 0.125–0.500% EMS 震盪處理 10 min，小孢子胚之發芽率降為對照組的 36.4–56.8%，但 3 個 EMS 濃度處理間差異不顯著。取「慶農 S-65」花蕾以 0.025–0.100% EMS 以靜置浸泡或添加 Tween 20 加震盪方式處理 5 min 或 10 min，結果顯示 2 種處理時間之胚分化率皆以 0.025% EMS 為最高。但採用震盪處理時，胚分化率會因處理濃度或時間延長而明顯下降。將 4 個不同結球天數 DH 品系單誘變小孢子 (UV 處理) 及利用雙誘變 (UV 處理小孢子 + EMS 處理小孢子胚) 所得之 DH 誘變株與其對照植株定植田間，於栽培 84 d 後調查 DH 誘變株之發育階段並比較與對照組之差異。綜合而言，誘變株發育階段之改變以提前發育比例較延後者為高，可作為未來預測誘變方向之參考。本誘變平台以 DH 品系為供體於小孢子培養過程中進行誘變處理獲得 DH 誘變株，除可縮短誘變育種時間並提高選拔效率外，DH 具有高度一致性之特性則有助於突變體之辨識。

關鍵詞：花椰菜、小孢子培養、雙單倍體、單倍體誘變。

前言

花椰菜原產歐洲地中海沿岸地區，喜冷涼乾燥之氣候，在台灣的種植面積約 3,055 ha，年產量 68,515 Mg，產值超過新台幣 19 億元，是台灣重要的蔬菜作物 (Council of Agriculture 2019)。成功的育種取決於豐富的遺傳多樣性及有效的篩選方法，傳統育種一般藉由引入新的遺傳組合來達到創造變異的目的。但許多作物在人類長期選種下，遺傳多樣性已大量流失，加上原生地的快速消失，多樣性種原的取得變得愈來愈困難。如何持續創造新的變異用以迎戰氣候變遷的挑戰，成為育種者必須嚴肅面對的問題。利用人為處理誘發植物遺傳物質如染色體、DNA 產生改變，稱之為人工誘變，其發生比例較自然產生之突變高出許

投稿日期：2020 年 11 月 26 日；接受日期：2021 年 3 月 26 日。
[*] 通訊作者：kai@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山園藝試驗分所植物保護系研究員兼系主任。台灣 高雄市。
[4] 農委會農業試驗所鳳山園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。
[5] 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[6] 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

多，育種者利用人工誘變產生突變體，進而利用這些突變種原促進遺傳基因重組、擴大遺傳變異、創造新種質，作為新品種育成的捷徑 (Predieri 2001)。人工誘變一般可分為物理法及化學藥劑誘變，物理誘變是利用各種輻射能量的傳遞來加速突變率，電磁輻射如 X 射線、γ 射線、紫外線，粒子輻射如 α 射線、β 射線及離子束等 (Broertjes & van Harten 2013)。化學誘變劑常用的有烷化劑，如甲基磺酸甲酯 (methyl methanesulfonate; MMS)、甲基磺酸乙酯 (ethyl methanesulphonate; EMS)、硫酸二甲酯 (dimethyl sulfate; DMS) 2-環氧丙烷、乙烯亞胺 (ethyleneimine; EI)，核酸鹼基類似物則有 5-溴脲嘧啶 (5-bromouracil; 5-BU)、5-氟脲嘧啶、5-溴脫氧脲嘧啶核苷，以及其他如疊氮化鈉 (NaN_3) 與抗生素等 (Pathirana 2011)。人工誘變雖可提高突變率，但突變株的選拔需要經過一定之代數。若以種子 (M0) 進行誘變，栽培至性狀選拔階段後選出突變株 (M1)，此時通常只有少數顯性突變可被選出，大多數的隱性突變必須種至 M2 方能進行篩選，對於一些數量遺傳控制的性狀，更要等到 M3 才能穩定選拔，並於 M4 加以確認。此外，若突變發生的頻率很低，則必須提高誘變族群之數量，才有機會篩選到所需之性狀 (Szarejko & Forster 2007)。綜上，若能在相同突變率下減少誘變族群所需之數量，並將篩選世代提早，將有機會提升傳統誘變系統之效率。

由配子體分化而來的植株，其染色體數是孢子體的一半，也就是所謂的單倍體，其染色體經過自然或人為倍加後成為雙單倍體 (doubled haploid; DH)。DH 的等位基因具同質性，可直接成為自交作物的純系，或作為異交作物生產 F_1 所需之親本。DH 不僅可縮短育種年限，並能提高選拔效率，對遺傳研究及育種工作的進行大有助益 (Szarejko & Forster 2007)。DH 可藉由組織培養技術培養配子體，如花藥、小孢子、子房或胚珠而得之 (Germanà 2011)。蕓苔屬 (*Brassica*) 植物的小孢子培養始於油菜 (Lichter 1982)，因小孢子培養效率較花藥培養為高，遂成為十字花科作物生產 DH 的主要途徑。DH 亦可作為誘導 (inducing) 及固定 (fixing) 突變的一個快速捷徑，因為隱性基因突變在 M1 即得以選拔，除加速突變體的獲得外，選拔的效率亦可提高 (Gik-Humanes & Barro 2009)。綜上所述，利用人工誘變結合小孢子培養生產突變體的 DH 品系，當突變的性狀為隱性遺傳時可提早於 M1 世代進行選拔之外，且 M1 同質突變體 (DH) 一對基因之分離比為 1：1，一般 M2 突變體之基因分離比為 3：1。在突變率相同情況下，M1 世代之 DH 選拔族群的規模可大幅縮小，在育種時間及投入成本上皆能因此有效縮減 (Forster & Thomas 2005)。

國內過去鮮少有利用單倍體生產系統結合誘變之研究，本研究擬藉由已建立之花椰菜小孢子培養系統及穩定的 DH 品系作為供體親 (Hsia *et al*. 2017a)，於小孢子培養過程中進行誘變處理，建立花椰菜雙單倍體誘變平台。除測試各種人工誘變處理所需之條件外，並將 DH 誘變株種植於田間進行初步觀察，作為未來改進雙單倍體誘變平台之基礎。

材料與方法

試驗材料

將「慶農 S-65」花椰菜小孢子培養而來之 DH 品系，於 2017–2018 年間種植於農業試驗所田間，連續調查 2 年之結球天數，從中選出 4 個結球期不同之 DH 品系，編號分別為 32、102、157 和 165，4 個 DH 品系其定植至花球採收所需日數如表 1 所示。取上述 4 個 DH 品系之自交種子與「慶農 S-65」F_1 種子播種於培養皿，發芽後移植至 60 格穴盤中培養。4 wk 後將小苗定植至 5 吋硬盆，於行政院農業委員會農業試驗所溫室中培養至開花。花椰菜於 5 吋硬盆生長期間，每週施用 1 次 1 g L^{-1} Peters (N：P_2O_5：K_2O = 20：20：20) 液肥，抽苔後每週改施 1 g L^{-1} 花寶三號 (N：P_2O_5：K_2O = 10：30：20) 液肥。植株花球發育後，將植株移入日溫/夜溫為 20℃/15℃、光照強度為 98.2 μmol m^{-2} s^{-1}，光照時間為 14 h 的生長箱中培養，植株開花後選擇適當發育階段之小花蕾進行誘變。

表 1. 源自「慶農 S-65」花椰菜小孢子培養之 4 個 DH 品系於田間種植 2 年之定植至花球採收所需日數。

Table 1. Head mature days of four DH lines derived from microspore culture of 'Chinglong S-65' cultivated in field for consecutive two years[z].

DH line	Year of 2017 head mature days	Year of 2018 head mature days	Mean head mature days
165	61	58	59.5 ± 2.1
102	71	68	69.5 ± 2.1
32	81	84	82.5 ± 2.1
157	89	90	89.5 ± 0.7

[z] Days from seed sowing to field planting are about 30 d. DH: doubled haploid.

試驗方法

以不同結球天數DH品系之小孢子進行UV誘變

取花椰菜 DH32、102、157 和 165 品系大小約 3–4 mm 之花蕾進行小孢子培養。小孢子分離及培養過程參照 Hsia *et al*. (2017a)，以 1/2 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) 添加 13% 蔗糖 (簡稱 1/2NLN-13) 培養液將小孢子懸浮液濃度調整為 4 × 10^5 小孢子 mL^{-1}，將 10 mL 小孢子懸浮液加入直徑 9 cm 塑膠培養皿中，使液面高度為 1.57 mm。使用 40 瓦 UV 燈管 (253.7 nm, G40T10, Sankyo Denki Co., Ueda, Japan)，燈管至培養皿之高度距離為 54.5 cm，對小孢子分別進行 10 s 及 20 s 之 UV 光照處理，每處理 3 重複，每重複 2–5 皿。UV 處理方式為先將 UV 燈打開，將裝有小孢子懸浮液之培養皿置於固定位置後，開始 UV 光照並計時。UV 處理完成後添加 1/2 NLN-13 培養液於培養皿中，並調整懸浮液濃度為 4 × 10^4 小孢子 mL^{-1}。將上述小孢子懸浮液分裝至直徑 6 cm 塑膠培養皿中，每皿加入 5 mL 小孢子懸浮液，培養 6 wk 後記錄小孢子胚分化之情形。

雙誘變處理

以上一試驗中 DH32 經 UV 光照 10 s 處理所分化之子葉期胚 (約 1 cm 長)，將胚分別置入含有0.125%、0.250%和0.500% (v/v) EMS 溶液與無菌水中，以水平迴轉式震盪器 80 rpm 震盪處理 10 min，之後將液體移除，並以培養液清洗胚共 3 次。接著，參照 Hsia *et al*. (2017b) 方法進行胚培養，於 4 wk 後記錄胚發芽情形。本試驗共 5 重複，每一重複為 10 個胚。

以 EMS 處理小花蕾後進行小孢子培養

試驗 A：採「慶農 S-65」花椰菜大小為 3–4 mm 之花蕾作為供試材料，每處理取 48 朵花蕾，將花蕾放入無菌水 (對照組) 或含有濃度 0.025%、0.050%、0.100% EMS 溶液中。置於室溫中浸泡 5 min 或 10 min 後，將液體移除，並以去離子水清洗 1 次。經 EMS 處理後之花蕾依照 Hsia *et al*. (2017a) 方法進行小孢子分離及培養，並於培養 6 wk 後記錄胚數。

試驗 B：每處理使用 45 朵之花蕾，處理方式同上之試驗 A，但於 EMS 溶液中添加 20 μL Tween 20，並以 80 rpm 進行震盪處理。

不同結球天數 DH 株系之小孢子經 UV 處理後獲得之 DH 誘變株於田間種植觀察

取參試 DH 品系經 UV 誘變處理獲得之小苗進行流式細胞儀檢測，將檢測為 2N 之發根瓶苗，出瓶種植於 3 吋黑色塑膠軟盆中於農業試驗所溫室中栽培。出瓶第一週進行保濕及遮陰處理，之後管理如一般種苗。出瓶苗經 1 個月馴化培養後，移入有頂之塑膠網室繼續培養 1 個月後，於 2019 年 11 月 8 日定植於農業試驗所網室。經於田間種植 84 d 後，調查植株之發育階段，並計算各發育階段 DH 誘變株之占比。

經 UV 與 EMS 處理雙重誘變之 DH 株種植田間進行發育觀察

DH32 品系之小孢子經 UV 處理後長出之胚再以 EMS 溶液處理，發芽小苗及出瓶馴化過程與上一試驗相同。誘變株於田間種植 84 d 後，調查植株之發育階段，並計算各發育階段 DH 誘變株之占比。

試驗設計和統計分析

本研究採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD) 進行試驗。試驗所得若為比例資料則先經角度轉換後再進行分析，經 SAS Enterprise Guide 7.1 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

以不同結球天數 DH 品系之小孢子進行 UV 誘變

本研究使用自「慶農 S-65」花椰菜小孢子培養而來之 4 個 DH 品系，4 個 DH 品系具有不同之結球天數，其中以 DH165 結球天數最短為 59.5 d，而以 DH157 最長為 89.5 d (表 1)。4 個 DH 品系之小孢子胚分化能力具差異性 (表 2)，未進行誘變處理之對照組以 DH32 每皿可獲得 105.2 個胚最高，DH102 的 48.7 胚/皿以及 DH165 的 34.5 胚/皿其次，而以 DH157 的 11.9 胚/皿最低。4 個 DH 品系之小孢子經 UV 誘變處理後，胚分化率與對照組相比皆顯著降低，UV 處理 10 s 時各 DH 品系胚分化率降至對照組的 45.0–65.1%，其中以 DH32 之 65.1% 胚分化率最高；在 UV 光照處理 20 s 後，4 個 DH 品系之胚分化率下降至對照組的 23.9–60.7%，仍以 DH32 之 60.7% 為最高 (圖 1)，而以 DH157 的 23.9% 最低。比較同一品系內經 UV 光照 10 s 或 20 s 對小孢子胚分化率的影響差異並不顯著，其中胚分化率較高之 DH32 與 DH102 呈現的差異較小，分別為 4.4% 與 1.7%；而胚分化率較低之 DH165 及 DH157 在延長 UV 處理時間後，呈現出較大之差異，分別為 15.9% 與 23.9%。觀察 UV 處理後之小孢子胚，其發芽率僅為對照組之 72.9−83.5%，但同一 DH 品系經 10 s 或 20 s 之 UV 處理後之胚發芽率則差異不明顯，在 2.0–5.0% 之間，相對而言，延長 UV 處理時間對胚分化的影響大於對胚發芽的影響。

雙誘變處理

取上述試驗中 DH32 經 UV 10 s 處理後形成之子葉期胚 (長度約 1 cm)，將胚分別置入含有 0.125、0.250 及 0.500% EMS 溶液中震盪處理 10 min。將胚取出以無菌水洗淨後培養於發芽培養基，經 4 wk 培養後調查胚發芽率，EMS 濃度由低至高之胚發芽率依序為 53、44

表 2. UV 光照處理時間對 4 個 DH 品系小孢子胚分化之影響。

Table 2. Effect of UV exposure time on microspore embryogenesis of four DH lines[z].

DH line	UV duration (s)	Embryos/petridish (relative %)	Germination (relative %)
165	0	34.5 ± 12.4 a[y](100.0)	75.4 (100.0)
	10	18.7 ± 6.0 b (54.2)	62.3 (82.6)
	20	13.2 ± 4.3 b (38.3)	60.8 (80.6)
102	0	48.7 ± 6.5 a[y] (100.0)	64.8 (100.0)
	10	21.9 ± 2.3 b (45.0)	54.1 (83.5)
	20	21.1 ± 0.9 b (43.3)	50.9 (78.5)
32	0	105.2 ± 11.6 a[y] (100.0)	99.0 (100.0)
	10	68.5 ± 11.4 b (65.1)	78.8 (79.6)
	20	63.9 ± 4.9 b (60.7)	76.3 (77.1)
157	0	11.9 ± 4.2 a[y] (100.0)	75.9 (100.0)
	10	5.4 ± 1.0 b (47.8)	59.3 (78.1)
	20	2.7 ± 0.4 b (23.9)	55.3 (72.9)

[z] Four DH lines were derived from microspore culture of ‘Chinglong S-65’. DH: doubled haploid; UV: ultraviolet.

[y] Means with different letters in the same DH line are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

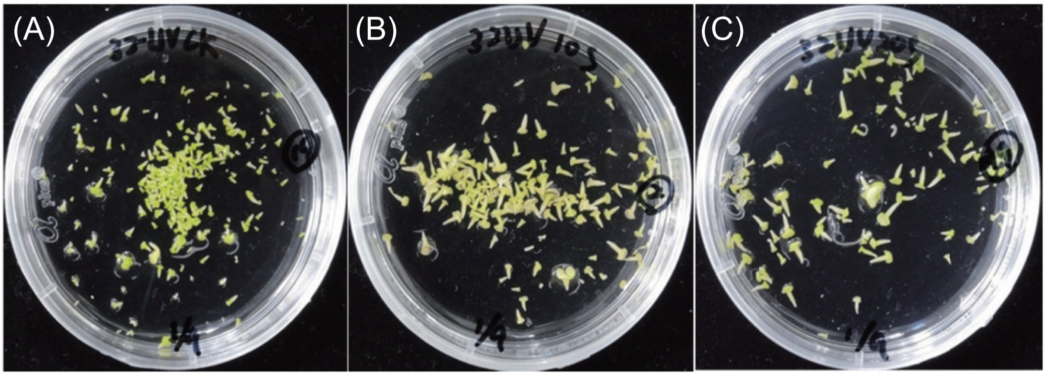


圖 1.　花椰菜 DH32 小孢子經 UV 照射 (A) 0 s、(B)10 s、(C) 20 s 後，經 4 wk 培養後之胚分化情形。

Fig. 1.　Microspore embryogenesis of DH32 derived from UV exposure for (A) 0 s, (B) 10 s and (C) 20 s after 4 wk of culturing.

及 34%，顯著低於對照組的 93.3%。顯示 EMS 濃度處理顯著影響胚發芽率，但不同 EMS 濃度處理間差異不顯著。然而，觀察 EMS 濃度提高後，芽體後續的生長狀況，明顯受到抑制 (表 3、圖 2)。

以 EMS 處理小花蕾後進行小孢子培養

靜置處理

取「慶農 S-65」花椰菜 3–4 mm 之小花蕾以不同濃度 EMS 靜置處理不同時間，將花蕾清洗後取其內之小孢子進行培養，各處理小孢子之胚分化率及其胚發芽率如表 4 所示。結果顯示，EMS 濃度與靜置處理時間兩因子對胚分化均有顯著影響，其中又以濃度的影響較顯著 (P < 0.001)，但 EMS 濃度和處理時間的交感效應並不顯著。胚分化率以對照組平均每皿 6.4 個胚最高，處理組中以 0.025% EMS 處理 5 min 具最高之胚分化率，隨處理濃度增加或處理時間延長，抑制小孢子胚的分化越明顯。觀察小孢子胚後續之發芽情形，以對照組具 89.2% 發芽率最高，隨著 EMS 處理濃度增加，胚發芽率有下降之趨勢。

表 3.　雙誘變處理之 EMS 濃度對花椰菜 DH32 子葉期胚發芽之影響。

Table 3.　Effect of EMS concentrations on germination of microspore embryos derived from UV 10 s treated microspores of DH32[z].

EMS (v/v) (%)	No. of treated embryos	Embryo germination (%)	Relative germination (%)
0	30	93.3 ± 5.8 a[y]	100.0
0.125	50	53.0 ± 17.9 b	56.8
0.250	50	44.0 ± 27.9 b	47.2
0.500	50	34.0 ± 11.4 b	36.4

[z] Microspore embryos were derived from UV 10 s treatment before using in the ethyl methanesulphonate (EMS) treatment.

[y] Means with different letters in the same column are significantly different by least significant difference (LSD) test at 5%, respectively.

震盪處理

本試驗與上述試驗使用相同 EMS 濃度與處理時間，但於 EMS 培養液中添加 Tween 20 並以震盪方式 (80 rpm) 進行處理，結果顯示如表 5。EMS 濃度與震盪處理時間兩因子對胚分化皆具有顯著之影響，其中以濃度的影響更為顯著 (P < 0.001)，濃度與處理時間的交感作用並不顯著。胚分化率以對照組平均每皿 19.7 個胚最高，0.025% EMS 處理組以 5 min 較 10 min 震盪處理具有較高之胚分化率，胚分化率會隨著 EMS 處理濃度增加而下降，0.05% 及 0.10% 濃度處理之胚分化率顯著減少。持續觀察小孢子胚後續的發芽情形，結果亦以對照組之 79.0% 為最高，0.025% EMS 處理 5 min 組其次，處理時間增至 10 min 時胚發芽率下降，其中 0.100% EMS 處理 5 min 組僅獲得 1 個胚，且未能順利發芽。

綜合靜置與添加 Tween 20 加震盪處理之

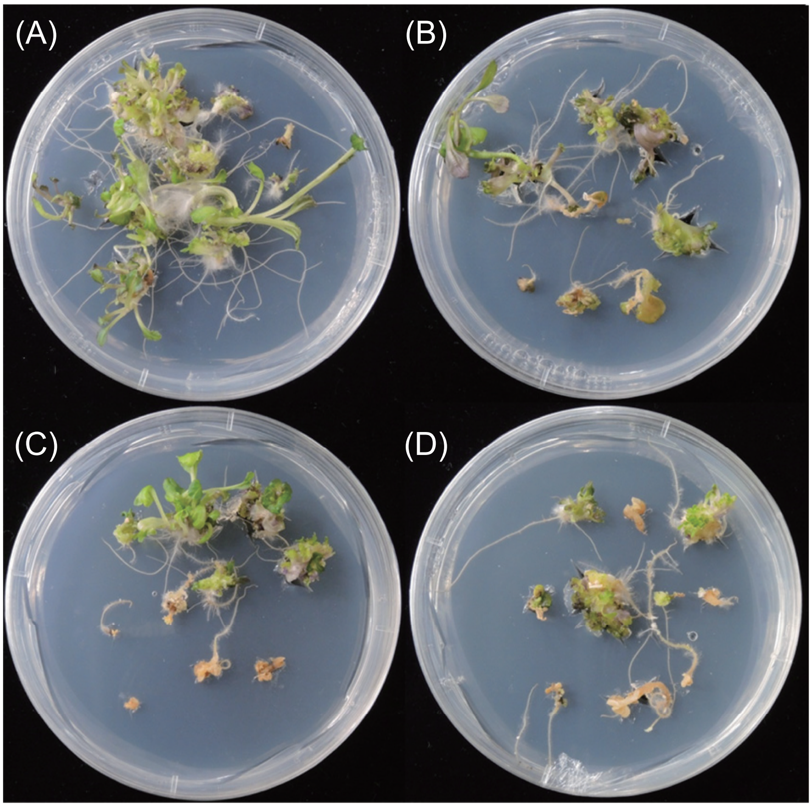


圖 2. 花椰菜 DH32 小孢子胚分別以濃度 (A) 0%、 (B) 0.125%、(C) 0.250%、(D) 0.500% EMS 處理 10 min 後，經 4 wk 培養後之發芽情形。

Fig. 2. Germination of microspore embryos of DH32 after 4 wk of culturing. Microspore embryos were derived from (A) 0%, (B) 0.125%, (C) 0.250% and (D) 0.500% ethyl methanesulphonate (EMS) for 10 min.

表 4. 花椰菜「慶農 S-65」花蕾以 EMS 靜置浸泡不同時間對小孢子胚分化之影響。

Table 4. Effect of EMS soaking flower buds for various time without shaking on microspore embryogenesis of cauliflower 'Chinglong S-65'[z].

EMS (v/v) (%)	Duration (min)	Total embryos	Embryos/petridish (relative %)	Germination (relative %)
0	5	83	6.4 ± 2.1 a[y] (100.0)	89.2 (100.0)
0.025	5	42	3.8 ± 1.7 b (59.4)	61.9 (69.4)
	10	32	2.7 ± 1.4 bc (42.2)	53.1 (59.5)
0.050	5	24	1.6 ± 1.2 cd (25.0)	41.7 (46.7)
	10	10	0.9 ± 0.8 d (14.1)	50.0 (56.1)
0.100	5	27	1.1 ± 1.2 d (17.2)	37.3 (41.8)
	10	16	0.8 ± 1.1 d (12.5)	37.5 (42.0)
Concentration			***	
Times			*	
Concentration × times			ns	

[z] A total of 48 flower buds were used in each treatment. Microspore culture medium was 1/2 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) with 4×10^4 microspores per mL. EMS: ethyl methanesulphonate.

[y] Means with different letters in the same column are significantly different by least significant difference (LSD) test. ns: non-significant; * and ***, significant at 5% and 0.1%, respectively.

表 5. 花椰菜「慶農 S-65」花蕾以添加 Tween 20 之 EMS 振盪處理不同時間對小孢子胚分化情形。

Table 5. Effect of flower buds soaking in EMS solution with Tween-20 for various shaking time on microspore embryogenesis of ‘Chinglong S-65’[z].

EMS (v/v) (%)	Duration (min)	Total embryos	Embryos/petridish (relative %)	Germination (relative %)
0	5	138	19.7 ± 3.7 a[y] (100.0)	79.0 (100.0)
0.025	5	84	9.3 ± 4.5 b (47.2)	72.6 (91.9)
	10	10	3.3 ± 3.1 c (16.8)	50.0 (63.3)
0.050	5	0	0.0 ± 0.0 c (0.0)	0.0 (0.0)
	10	0	0.0 ± 0.0 c (0.0)	0.0 (0.0)
0.100	5	1	0.2 ± 0.4 c (1.0)	0.0 (0.0)
	10	-	-	-
Concentration			***	
Times			*	
Concentration × Times		ns		

[z] A total of 48 flower buds were used in each treatment. Microspore culture medium was 1/2 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) with 4 × 10^4 microspores per mL. EMS: ethyl methanesulphonate.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different by least significant difference (LSD) test. ns: non-significant; * and *** significant at 5% and 0.1%, respectively.

結果，顯示 2 種處理方式皆以 0.025% EMS 有較高之胚分化率，但採用添加 Tween 20 加震盪處理時，胚分化率會因處理濃度或時間延長而明顯下降。

以 UV 處理 4 個 DH 品系小孢子獲得之 DH 誘變株於田間之發育表現

將 UV 處理 4 個 DH 品系之小孢子所獲得之 DH 植株，於田間種植 84 d 後進行調查，記錄誘變株發育階段之占比 (表 6、圖 3)。4 個 DH 品系定植至花球採收所需日數如表 1 所示，其中結球天數最短之 DH165 (59.5 d)，在定植 84 d 後，對照組 100% 皆已開花，但 UV 10 s 處理組仍有 1 株誘變株尚為結球階段 (3.8%)，發育時期明顯延後。DH102 之結球天數約 70 d，於定植 84 d 後，對照組 100% 處於抽苔及開花之生殖階段，但 UV 10 s 及 UV 20 s 處理組分別仍有 11.3% (1.4% + 9.9%) 與 2.8% 誘變株尚處於結球階段。DH32 結球天數為 80 d，於定植後 84 d，對照組 100% 之發育階段皆為結球前期 (球緊實)，但 UV 10 s 及 UV 20 s 處理誘變株之發育階段明顯提前，分別有 79.1% 與 73.7% 已達抽苔及開花期。DH157 之結球天數為 89.5 d，於定植 84 d 後，對照組之發育階段亦 100% 處於結球前期，但 UV 10 s 及 UV 20 s 處理誘變株發育階段亦明顯提前，分別有 53.6% 與 63.6% 誘變株已達結球晚期 (球鬆散)，更分別有 21.4% 與 36.4% 已處於花序抽出之抽苔期 (生殖階段)。綜觀 4 個不同結球天數之 DH 品系，其誘變株發育階段的表現比率與對照組相較，有不同比例之提前或延後發育表現，但整體以提前發育較延後之比例為高。

經 UV 與 EMS 雙重誘變獲得之 DH 植株於田間種植之發育表現

以 DH32 品系之小孢子經 UV 處理後長出之子葉期胚，再以 EMS 溶液進行誘變處理，所獲得之誘變株於田間種植 84 d 後調查其發育階段，並計算各誘變株發育階段之占比，結果如表 7 所示。DH32 之結球天數為 80 d，於定植 84 d 後其發育階段應為結球期，單誘變對照組 (僅 UV 處理) 顯示以生殖階段占比最高 (83.4%)，少數為結球晚期 (16.7%)。雙誘變 (UV + EMS) 發育時期於生殖階段之比例為 88.3–100.0%，皆高於單誘變 (UV) 對照組之 83.4%。因生殖階段與結球晚期為連續相鄰之生理時期，較難認定其為處理差異，但 0.125% EMS 處理有 7.1% 不正常植株，可作為誘變效果的間接證明。

表 6. 不同結球天數之 4 個 DH 株系其小孢子以 UV 照射後所獲得 DH 誘變株於田間種植 84 d 後之發育階段調查。

Table 6. Developmental stages of mutants derived from UV treated microspores of four DH lines after 84 d growing in the field[z].

			Developmental stage %				
			Heading				
DH line	Plants derived from	No. of plants	Early	Late	Reproduction[y]	Abnormal	Dead
165	CK	2	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	UV-10 s	26	0.0	3.8	96.2	0.0	0.0
	UV-20 s	27	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
102	CK	6	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	UV-10 s	71	1.4	9.9	88.7	0.0	0.0
	UV-20 s	36	0.0	2.8	91.7	2.8	2.8
32	CK	2	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	UV-10 s	43	2.3	14.0	79.1	0.0	4.7
	UV-20 s	57	5.3	19.3	73.7	0.0	1.8
157	CK	4	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	UV-10 s	28	21.4	53.6	21.4	3.6	0.0
	UV-20 s	22	0.0	63.6	36.4	0.0	0.0

[z] Four DH lines were derived from microspore culture of ‘Chinglong S-65’. DH: doubled haploid; UV: ultraviolet. CK: control check.
[y] Reproductive stage includes bolting and flowering stages.

討論

UV 誘變對胚分化的影響

利用單倍體相較以 2 倍體進行誘變具有許多優點，如選拔世代可提前、有利於隱性基因的選拔以及毋須自交純化等 (Kott 1995; Szarejko & Forster 2007)。單倍體誘變進行之方式可分為兩種，一是以種子 (M0) 進行誘變，以誘變株 (M1) 所開之花進行小孢子培養獲得 DH；二是直接以配子體之組織如花序、花蕾或配子體本身如小孢子來進行誘變處理。兩法皆可直接獲得同質之 M2 世代 (DH)，可節省大量育種資源，但前提是必須對供體親的小孢子胚分化表現有所瞭解，才能對誘變結果有正確之預估。從這個角度來看，本次研究選用的 4 個 DH 品系，其小孢子胚分化率較高的有 DH32 與 DH102，每皿 (含 4×10^5 個小孢子) 有近 50 個或以上之胚分化，是進行誘變較佳之材料，而 DH157 與 DH165 的胚分化率較低 (11.9–34.5 個胚/皿)。若想要獲得與 DH32 相同數量之誘變個體，則須增大其誘變的規模 (表 6)。本研究在試驗規劃時，選擇以 DH 品系作為供體親利用其小孢子作為誘變材料，著眼點在於同一 DH 品系內之個體具高度一致性，並以結球天數作為選擇 DH 的標準，但未考慮不同 DH 品系間小孢子胚分化率的差異。因此，建議未來此類型之研究，宜先篩選小孢子胚分化率較高之 DH 品系作為雙單倍誘變平台之材料。

本研究中使用了物理及化學兩種誘變方法，物理方法因毋需接觸培植體，對於必須保持無菌狀態的組織培養系統是相對理想之誘變方法。物理誘變中以 UV 光設備相對其他種類之放射線較易取得，但 UV 光的穿透性相較其他放射光線為差。因此，一般適用於單層而非多層細胞之組織，而屬於單細胞階段的小孢子，正好符合此項要求。Barro *et al*. (2003) 以衣索比亞芥菜 (Ethiopian mustard, *Brassica carinata* Braun) 小孢子進行 UV 誘變，指出培養皿中的培養液高度會影響小孢子後續的分裂性，原因即與 UV 穿透性有關。本研究中誘變所用之小孢子懸浮液高度為 1.57 mm，是經測試可克服懸浮液表面張力之最小液體量，同時符合 Barro *et al*. (2003) 指出液面高度不超過

圖 3. 源自 4 個不同結球天數 DH 株系之小孢子經 UV 處理後所得之雙單倍體誘變株於田間種植 84 d 後之生長情形。(A1–A3) DH165；(B1–B3) DH102；(C1–C3) DH32；(D1–D3) DH157。UV 處理時間 (A1, B1, C1, D1) 0 s；(A2, B2, C2, D2) 10 s；(A3, B3, C3, D3) 20 s。

Fig. 3. Growth of mutants derived from ultraviolet (UV) exposure for (A1, B1, C1, D1) 0 s; (A2, B2, C2, D2) 10 s; and (A3, B3, C3, D3) 20 s. Mutants were derived from (A1–A3) DH165; (B1–B3) DH102; (C1–C3) DH32; and (D1–D3) DH157.

表 7. 經雙誘變之 DH 誘變株於田間生長發育之情形。雙誘變 DH 植株源自花椰菜 DH32 之小孢子經 UV 處理後分化之小孢子胚再施以 EMS 處理。

Table 7. Developmental stages of double mutated plants after 84 d growing in the field. Mutation plants were derived from EMS treated microspore embryos which were derived from UV treated microspores of DH32[z].

Plants derived from EMS (%)	No. of plants	Developing stage %				
		Heading				
		Early	Late	Reproductive[y]	Abnormal	Dead
0	6	0.0	16.7	83.4	0.0	0.0
0.125	14	0.0	0.0	92.8	7.1	0.0
0.250	17	0.0	11.8	88.3	0.0	0.0
0.500	5	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0

[z] DH: doubled haploid; UV: ultraviolet; EMS: ethyl methanesulphonate.
[y] Reproductive stage includes boltine and flowering stages.

2 mm 之建議。MacDonald *et al*. (1991) 以油菜 (*Brassica napus*) 小孢子進行 UV、Gamma 及 X 射線誘變，結果顯示 Gamma 及 X 射線對小孢子胚的分化率與發芽率影響顯著，而 UV (0–60 s) 處理雖然隨著處理時間增加會影響小孢子胚分化率，但對後續之胚發芽率不會造成影響。本研究中以 4 個 DH 品系之小孢子進行 2 種時間的 UV 處理，結果顯示 10 s 與 20 s 處理對胚分化率的影響不顯著，差異在 1.7–23.9% 間，相對胚發芽率差異在 2.0–5.0% 間。本研究結果雖然顯示胚發芽率受 UV 處理時間延長的影響較胚分化率為低，但並非完全不受到影響，與 MacDonald *et al*. (1991) 結果並非完全一致。推測 MacDonald *et al*. (1991) 以胚分化率較高的油菜作為材料，導致 UV 對胚發芽率的影響變得相對不明顯。整體而言，本研究結果顯示，短時間 UV 光照處理僅對小孢子胚分化產生影響，而對於之後的胚發芽影響較小，可視為 UV 誘變的優點。

由於作物種類對誘變的反應具有特異性，一般多以處理後培植體或植株存活 1/2 的劑量，即半致死劑量 (LD_{50}) 作為誘變敏感性的指標。Ahmad *et al*. (1991) 指出油菜小孢子 UV 處理的 LD_{50} 為 10 s。Zhang & Takahata (1999) 對大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. pekinesis) 的研究顯示，延長 UV 處理時間會造成胚分化率下降，超過 20 s 時胚分化率會大幅下降，並估算 LD_{50} 為 12 s。比較本研究 10 s 及 20 s 處理之間的差異，以 DH165 與 DH157 差異較大，在 15.9–23.9 個胚/皿之間，而以 DH32 與 DH102 差異較小，在 1.7–4.4 個胚/皿之間 (表 2)。上述結果除顯示不同品系對 UV 耐受性具有個別差異外，亦顯示胚分化率較高的品系在 UV 處理時間延長時所受到的影響較小。此外，Barro *et al*. (2003) 以 UV 對衣索比亞芥菜處理的研究，結果顯示 LD_{50} 為 8 min。此一結果與 Ahmad *et al*. (1991) 及本研究之結果差異較大，惟 Barro *et al*. (2003) 自己推測原因為衣索比亞芥菜對 UV 輻射的耐受度較高所致。

以小孢子胚作為 EMS 誘變之材料

本研究將 DH32 經過 UV 光照 10 s 處理後獲得之小孢子胚，再施以不同濃度 EMS 進行雙誘變處理，對照組 (0% EMS) 之胚發芽率為 93.3% (表 3)。但經 3 種 EMS 濃度處理後之胚發芽率，則分別下降 43.2–63.6%。由此推測，EMS 處理的 LD_{50} 濃度，應該在 0.125–0.250% 之間 (表 3)。過去十字花科作物的研究顯示，EMS 大都施用於小孢子培養階段 (Barro *et al*. 2001; Ferrie & Keller 2002; Polsoni *et al*. 2011)，僅少數如 Shi *et al*. (1997) 是將油菜小孢子胚的上胚軸切成 0.7 cm 長，再以含有 0、0.20、0.25 及 0.50% EMS 之 Murashige & Skoog (MS) 培養液處理 3–10 h。結果顯示，培植體的成活率會隨著 EMS 濃度增加而下降，其中 D083 品系以 0.20% 處理 4 h 的相對胚發芽率為 63.4%，而以 0.25% 處理 4 h 為 45.7%。因此推測其 LD_{50} 濃度應在 0.20–0.25% 之間，與本研究之結果相類似。過去以小孢子胚進行 EMS 誘變的研究較少，主要是油菜小孢子的分化率相當高，因此大部分的誘

變皆於小孢子培養階段實施。但對於小孢子胚分化率偏低的其他蕓苔屬作物，如甘藍類或芥菜類作物而言，建議可以考慮利用小孢子胚作為誘變之材料，較能掌握最後可獲得之誘變數量，本研究結果亦證實此一觀點的可行性。此外，UV 與 EMS 雙重誘變植株於田間之表現 (表 7)，則顯示增加 EMS 之雙重誘變處理會導致誘變株之發育階段更趨提前。此點對於突變率偏低的作物而言，雙重誘變或許是可以不增加致死率但能提升突變率的可行方法。

以花蕾進行 EMS 誘變處理

Dai (2013) 以大白菜 (*B. campestris* ssp. *pekinensis*) 的種子及花蕾分別進行誘變，其中種子以 0.4–0.8% EMS 處理 4–6 h，從 614 株後代中篩選出 49 株變異株，突變率為 7.98%；而花蕾以 0.03–0.10% EMS 處理 5–10 min 後，取其小孢子進行培養，突變率為 15.60%。除此之外，並觀察到花蕾誘變所獲得之變異型態較種子誘變更為多樣性。Lu *et al*. (2016) 利用 0.03–0.10% EMS 以緩和震動方式處理大白菜花蕾 5–10 min，之後取小孢子進行培養，結果從 475 株後代中篩選出 142 變異株，突變率為 29.90%，證實花蕾誘變是進行單倍體誘變的選項之一。Prem *et al*. (2011) 以印度芥菜 (India mustard, *Brassica juncea*) 種子進行誘變並培養其小孢子獲得 DH 株，利用正交對比進行各因子之變異數分析 (orthogonal contrast partitioning ANOVA)，結果顯示誘變劑 EMS 及 ENU (ethyl nitrosourea) 及其濃度與誘變後的成活率呈現線性關係，但誘變劑的處理時間與成活率之間則不具線性關係。本研究以不同 EMS 濃度利用靜置或添加 Tween 20 加震盪方式處理花蕾不同時間，結果顯示靜置或震盪處理所得結果相似 (表 4、表 5)，亦即 EMS 濃度與處理時間 2 因子對胚分化率均產生顯著影響。其中，又以濃度 (P < 0.001) 較時間 (P < 0.05) 影響顯著，但 EMS 濃度和處理時間之間的交感並不顯著。Dai (2013) 與 Lu *et al*. (2016) 之研究，前者未述及是否施以震盪處理，後者則未詳述震盪方法及強度，因此難以與之相互比較。本研究中花椰菜花蕾以靜置方式處理時，結果以 0.025% EMS 處理 5–10 min 較佳，與上述大白菜之研究結果相類似，但若添加 Tween 20 並配合震盪方式處理，則以 0.025% EMS 處理 5 min 最適當。提高濃度至 0.050% 以上或延長處理時間至 10 min，胚分化率皆明顯下降，顯示震盪處理或 Tween 20 其中之一或是兩者皆具有增加 EMS 效果之協同作用。

UV 誘變株的田間表現

本次研究選用 4 個源自於「慶農 S-65」小孢子培養的 DH 品系，依據連續 2 年田間種植資料，選出定植至花球採收日數從 60–90 d 共 4 個 DH 品系，作為誘變材料小孢子的供體親。本研究採用 DH 品系而非 F_1 作為小孢子供體材料進行誘變的原因，是想藉由 DH 的高度一致性，提高突變體的篩選效率，為節省人力於種植 84 d 後僅針對 DH 誘變株之發育階段特性進行調查。本研究之花蕾誘變試驗中亦採用了「慶農 S-65」(F_1) 進行單倍體誘變，但基於 F_1 小孢子培養所得之誘變株為一分離族群 (F_2)，誘變株外表型之差異，可能來自遺傳分離或誘變，因無法區別差異的來源，為節省調查人力，因此並未進行此批誘變 DH 植株的田間種植。

比較 4 個 DH 品系 UV 誘變株於田間發育時期的表現，結果顯示 UV 處理 10 s 及 20 s 之差異並不明顯 (表 6)。4 個 DH 誘變族群之發育時期與對照組相較，皆以提早發育的比率較高，在 DH32 為 93.0–93.1%，在 DH157 為 75.0–100.0%；而以延遲發育表現的比率較低，在 DH165 為 0–3.8%，在 DH102 為 2.8–11.3%。花椰菜之生產受栽培地區環境因子之影響甚大，針對不同栽培地區需要提供不同熟性之品種，本研究顯示誘變處理可能改變花椰菜發育之快慢，未來有可於優良 DH 品系中利用誘變處理誘導出不同成熟期之近同源系，擴大品種的環境適應範圍。同時本研究之觀察將提供吾人對不同誘變方法及其誘變方向的變化有所瞭解，有助未來進行誘變時對突變趨勢的正確評估。

結語

本研究目的為建立花椰菜單倍體誘變平台，測試之誘變方法包括以 UV 處理 DH 小孢

子、以 EMS 處理 DH 小孢子胚以及以 EMS 處理花蕾，並以誘變產生之 DH 植株種於田間對植株之發育狀態進行觀察。結果顯示 UV 處理施用於小孢子培養階段，處理時間在 10 s 至 20 s 間較為適當，處理時間超過 30 s 時小孢子之成活率會大幅下降 (資料未顯示)。化學誘變方面採用花蕾及小孢子胚兩種材料，其中花蕾以 0.025% EMS 靜置處理 5 或 10 min，或以相同濃度震盪處理 5 min；小孢子胚則以 0.125–0.250% EMS 震盪 10 min，胚分化率最接近 LD_{50}，對於小孢子胚分化率較高之供試材料建議可提高誘變強度。在突變體篩選方面，本研究採用遺傳同質性一致之 DH 品系為供試材料，有助篩選效率的提升。以植株發育階段產生之變化來看，UV 及 EMS 誘變株皆以提早發育較延遲發育之比例為高，這點可提供育種者在誘變目標設定時作為參考。隨著反向遺傳學的進步，DH 突變族群可利用定向誘導基因組局部突變技術 targeting induced local lesions in genomics (TILLING) 快速、有效的篩選突變，未來配合次世代定序技術及表型體精準篩選系統，將可縮短育種流程並提高選種效率，且雙單倍體誘變系統的建立將有助功能基因組學研究、種質資源創新以及作物遺傳改良方面的提升。

誌謝

本研究係執行科技部計畫編號：MOST 107-2321-B-055-001 之成果。試驗期間承郭雅芩小姐及紀銘坤、蘇永傑先生三位助理協助，特此申謝。

引用文獻

Ahmad, I., J. P. Day, M. V. MacDonald, and D. S. Ingram. 1991. Haploid culture and UV mutagenesis in rapid-cycling *Brassica napus* for the generation of resistance to chlorsulfuron and *Alternaria brassicicola*. Ann. Bot. 67:521–525. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a088193

Barro, F., J. Fernández-Escobar, M. De La Vega, and A. Martin. 2001. Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. Plant Breed. 120:262–264. doi:10.1046/j.1439-0523.2001.00602.x

Barro, F., J. Fernández-Escobar, M. De La Vega, and A. Martin. 2003. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. Euphytica 129:1–6. doi:10.1023/A:1021578318098

Broertjes, C. and A. M. van Harten. 2013. Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. Elsevier Science Publishing. New York, NY. 345 pp.

Council of Agriculture. 2019. Agricultural Statistics Yearbook 2018. http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx (visit on 01/09/2019)

Dai, S. Y. 2013. Research on Mutants of Chinese Cabbage by EMS Mutagenic Buds Combining with Microspore Culture. Master Thesis. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei. Baoding, China. 41 pp. (in Chinese with English abstract)

Ferrie, A. M. R. and W. A. Keller. 2002. Application of double haploidy and mutagenesis in Brassica. *in*: Thirteenth Crucifere Genetics Workshop. March 23–26, 2002. Davis, CA. University of California, Davis, CA.

Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breed Rev. 25:57–88.

Germanà, M. A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. Plant Cell Rep. 30:839–857. doi:10.1007/s00299-011-1061-7

Gik-Humanes, J. and F. Barro. 2009. Production of Doubled Haploids in Brassica. p.65−73. *in*: Advances in Haploid Production in Higher Plants. (Touraev, A., B. P. Forster, and S. M. Jain, eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. 348 pp.

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, Y. M. Chou, and T. K. Lin. 2017a. Studies on microspore culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. J. Taiwan Agric. Res. 66:94–104. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06602.02

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, and Y. M. Chou. 2017b. Development of microspore embryogenesis and Plant Regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*. J. Taiwan Agric. Res. 66:184–192. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06603.02

Kott, L. 1995. Production of mutants using the rapeseed doubled haploid system. p.505–515. *in*: Proceedings of International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. June 19–23, 1995. Vienne, Austria. In-

ternational Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 748 pp.

Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105:427–434. doi:10.1016/S0044-328X(82)80040-8

Lu, Y., S. Dai, A. Gu, M. Liu, Y. Wang, S. Luo, Y. Zhao, S. Wang, S. Xuan, X. Chen, X. Li, G. Bonnema, J. Zhao, and S. Shen. 2016. Microspore induced doubled haploids production from ethyl methanesulfonate (EMS) soaked flower buds is an efficient strategy for mutagenesis in Chinese cabbage. Front. Plant Sci. 7:1780. doi:10.3389/fpls.2016.01780

MacDonald, M. V., I. Ahmad, J. O. M. Menten, and D. S. Ingram. 1991. Haploid culture and *in vitro* mutagenesis (UV light, X-rays, and gamma rays) of rapid cycling *Brassica napus* for improved resistance to disease. p.129–138. *in*: Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. Vol. 2. June 18–22, 1990. Vienna, Austria. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 498 pp.

Pathirana, R. 2011. Plant mutation breeding in agriculture. CAB Rev.: Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour. 6:1–20.

Polsoni, L., L. S. Kott, and W. D. Beversdorf. 2011. Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. Can. J. Bot. 66:1681–1685. doi:10.1139/b88-230

Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64:185–210. doi:10.1023/A:1010623203554

Prem, D., K. Gupta, and A. Agnihotri. 2011. Can we predict mutagen-induced damage in plant systems mathematically? Insights from zygotic embryo and haploid mutagenesis in Indian mustard (*Brassica juncea*). Bot. Serbica 35:137–143.

Shi, S. W., Y. M. Zhou, and H. L. Liu. 1997. EMS mutagenesis of microspore-derived embryogenic cultures of *Brassica napus*. MBNL 43:8–9.

Szarejko, I. and B. P. Forster. 2007. Doubled haploidy and induced mutation. Euphtica. 158:359–370. doi:10.1007/s10681-006-9241-1

Zhang, F. I. and Y. Takahata. 1999. Microspore mutagenesis and *in vitro* selection for resistance to soft rot disease in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Breed Sci. 49:161–166. doi:10.1270/jsbbs.49.161

Establishment of a Doubled Haploid Mutagenesis Platform in Cauliflower

Chi-Ni Hsia[1], Uei-Chern Chen[2], Shiow-Huey Hseu[3], Chen-Yu Lin[4], Chin-Yi Tsao[5], and Tzu-Kai Lin[6,*]

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, S. H. Hseu, C. Y. Lin, C. Y. Tsao, and T. K. Lin. 2021. Establishment of a doubled haploid mutagenesis platform in cauliflower. J. Taiwan Agric. Res. 70(3):182–195.

An integrated haploid mutagenesis platform through doubled haploid (DH) donor plants providing microspores in cauliflowers was established in this study. Ultraviolet (UV) irradiation was applied to microspores of four DH lines derived from 'Chinglong S-65' and each line with various heading mature days. Embryos derived from UV treated microspores of DH32 as stated above were treated with ethyl methanesulphonate (EMS) subsequently for double mutagenesis. EMS was also applied on flower buds of 'Chinglong S-65' before microspore culturing for mutagenesis. The results showed that embryo production (embryos/petri dish) from two UV exposure duration in all four DH lines was significantly lower, accounting for 23.9% to 65.1% decrease compared to the control. However, no significant difference was observed on embryo production between the two UV exposure duration. The results also showed that embryo germination rate of the UV treated microspores decreasing 50.9 to 78.8% compared to that of the control. Cotyledonary embryos of DH32 derived from the UV 10 s treatment were soaked in 0.125–0.5% ethyl methanesulphonate (EMS) for 10 min. Embryo germination rates decreased in all EMS treatments by 36.4% to 56.8% compared to that of the control. However, no significant difference was found among tree EMS treatments. Flower buds of 'Chinglong S-65' were soaked in 0.025–0.1% EMS for 5 or 10 min with or without shaking for mutagenesis before microspore culturing. The results showed that regardless exposure time, the highest embryo production was obtained in buds treated with 0.025% EMS. However, embryo production decreased as exposure time increased and shaking was applied. DH plants derived from the UV or double mutagenesis (UV plus EMS) of four of DH lines were cultivated in the field and data were recorded at 84 d after cultivation. Field observation concluded that percentage of early growth rate was higher than that of delaying based on developmental performance of DH mutants in the four DH lines. Our results not only provide useful information for prediction of mutant tendency in cauliflower but also demonstrate that haploid mutagenesis is capable of shortening time span and enhancing selection efficiency on breeding. Additionally, this study demonstrated that trait screening on mutants was more efficient than using the highly uniform DH as donor plants for haploid mutagenesis.

Key words: *Brassica oleracea* var. *botrytis* L., Microspore culture, Doubled haploid, Haploid mutagenesis.

Received: November 26, 2020; Accepted: March 26, 2021.

[*] Corresponding author, e-mail: kai@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow and Head, Plant Protection Department, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Vegetable Department, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[5] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[6] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(3):196–205 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202109_70(3).0004 研究報告

由 *Corynespora cassiicola* 引起之羅勒枝枯病

湯佳蓉 [1,*] 蔡叔芬 [2] 陳思妤 [3] 馮繹升 [2]

摘要

湯佳蓉、蔡叔芬、陳思妤、馮繹升。2021。由 *Corynespora cassiicola* 引起之羅勒枝枯病。台灣農業研究 70(3):196–205。

羅勒枝枯病 (basil dieback) 為羅勒栽培時期的真菌病害之一，於屏東縣萬丹鄉發現羅勒植株的枝條於採收後，從枝條傷口處開始乾枯，呈現黑褐色壞疽狀病徵，逐漸蔓延至全株、死亡。從不同羅勒栽培區，相同病徵的罹病組織中分離出同一種真菌。室溫下，於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 培養 10 d 後，呈現邊緣為白色至淺灰色，中央為深橄欖綠色的菌落。根據此病原菌之型態特徵，與核醣體核酸基因 (rDNA) 的內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 序列鑑定結果，將該病原菌鑑定為 *Corynespora cassiicola*，並以柯霍氏法則證明，此真菌為造成羅勒枝枯病之病原菌。菌絲生長溫度範圍為 15–35℃，孢子發芽溫度範圍為 10–35℃。在 25℃ 下，維持連續 48 h 高濕度環境中，羅勒枝枯病之罹病率可達 75%，為此病害最適發病條件。評估植物保護資訊系統中，羅勒葉斑病 (*Alternaria alternata* 引起) 之推薦用藥，四氯異苯腈、保粒黴素 (甲)、依普同與克收欣，於濃度 1、10 與 100 ppm，對羅勒枝枯病菌菌株 CC-2、CC-3 在 PDA 上菌絲生長之影響。結果發現，依普同對 CC-2 與 CC-3 均有最佳的菌絲生長抑制率，分別為 64.4–77.0% 與 65.0–75.4%；克收欣次之，分別為 60.7–66.8% 與 58.8–63.6%，而四氯異苯腈與保粒黴素 (甲) 則介於 40–50%。故依羅勒葉斑病 (*A. alternata*, leaf spot) 推薦藥劑之稀釋倍數使用，可同時防治羅勒枝枯病發生。

關鍵詞：羅勒、枝枯病、鐵刀木棒狀桿孢菌。

前言

羅勒 (*Ocimum basilicum*) 俗稱九層塔，屬於唇形目 (Lamiales)、唇形科 (Lamiaceae)、羅勒屬 (*Ocimum*) 一年生或多年生香草植物，廣泛種植於溫帶、亞熱帶與熱帶地區 (Bilal *et al*. 2012)。羅勒原產於印度及埃及，引進台灣後多應用於烹飪、藥用、提煉精油及景觀園藝作物。於烹飪時多使用嫩莖與葉片進行調味，其種子與葉片則可入藥，應用範圍廣泛。羅勒品種可分為甜羅勒 (sweet basil)、皺葉羅勒 (lettuce-leafed basil)、紫紅羅勒 (dark opal basil)、檸檬羅勒 (lemon basil)、肉桂羅勒 (cinnamon basil)、聖羅勒 (holy basil)、希臘羅勒 (greek basil) 及灌木羅勒 (bush basil) (Paton & Putievsky 1996)。在台灣，灌木羅勒又稱為九層塔，有 2 個主要栽培品種，分為綠莖種與紫莖種，分別稱作白骨九層塔與紅骨九層塔、紫梗羅勒。由行政院農業委員會農業統計資料 (https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx) 指出，2019 年特作作物類之羅勒栽培面積為 147.53 ha，主要栽培區於雲林縣與屏東縣，分別有 69.26 ha 與 31.96 ha。

Tzeng *et al*. (2019) 指出，羅勒正式記載的病害有葉枯病 [*Alternaria alternata* (Franch) Keissl., *Coleosporium perillae* Syd. 引起]、萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *basilica* Tamietti & Matta 引起)、露菌病 [*Peronospora belbah-*

投稿日期：2021 年 1 月 27 日；接受日期：2021 年 4 月 21 日。
* 通訊作者：jrtang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系技工。台灣 高雄市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系計畫助理。台灣 高雄市。

rii Thines, *Pseudocercospora ocimicola* (Petr. & Cif.) Deighton 引起]、菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 引起]、細菌性葉斑病 [*Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 引起]、甜菜西方黃化病毒 [*Beet western yellow virus* (BWYV) 引起] 及蠶豆萎凋病毒 (*Broad bean wilt virus* 引起)。在屏東縣萬丹鄉羅勒栽培田區，於 2019 年 9 月份至 2020 年 3 月份，陸續發現有部分羅勒枝條呈現黑褐色壞疽斑，嚴重者全株呈焦枯狀且停止生長，於初步診斷病兆時，發現有 *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei 之分生孢子與產孢梗。Garibaldi *et al*. (2007) 與 Pereira *et al*. (2019) 均指出 *C. cassiicola* 可造成甜羅勒葉斑病 (leaf spot)。在台灣，尚無由 *C. cassiicola* 引起之羅勒枝枯病相關正式報告，因此本研究針對羅勒枝枯病之病徵、病原真菌之形態特徵、分子生物鑑定、病原菌最適發病溫度及病原菌對藥劑感受性進行探討，期望對本病害之診斷鑑定與病害防治有所助益。

材料與方法

病原菌分離與保存

自屏東縣羅勒栽培區採集罹患羅勒枝枯病的植物組織樣本，於實驗室進行組織表面消毒。消毒方式為：在組織表面噴灑 75% (v/v) 酒精，待組織表面乾燥後，使用滅菌過的解剖刀切取病、健部相鄰的植物組織，於 0.1% (v/v) 次氯酸鈉水溶液中漂洗 90 s，並以無菌水漂洗 2 次。以滅菌過的擦手紙，吸乾羅勒組織表面多餘的水分後，置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上分離病原菌。於室溫下 5 d 後，切取菌絲尖端移置馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar; PDA)，待其產孢後進行單孢培養，並將其保存於砂管 (10% sand + 1% agar) 中於室溫下保存備用。本研究使用供試菌株來源 CC-2 與 CC-3 分別由屏東縣枋寮鄉與屏東縣萬丹鄉羅勒罹病植株上分離。

病原菌形態與分子生物鑑定

以無菌刮鬍刀片進行罹病組織縱向切片，用以觀察病原菌之產孢梗與其分生孢子。另外，將病原菌單孢培養於 PDA 平板上，於 25℃下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 7 d 後觀察菌落形態。以光學顯微鏡 (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) 觀察分生孢子型態，並以 Metrics 軟體 (TUCSEN, Fuzhou, China) 量測 50 個分生孢子之長度與寬度，參考 Mmbaga *et al*. (2015) 與 Pereira *et al*. (2019) 敘述分生孢子梗、分生孢子之型態與特徵，鑑定田間分離之菌株。此外，分子生物鑑定則是收集單孢培養於 PDA 斜面的菌絲，參考 DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 建議方式抽取 DNA，以 PCR Master Mix II (GeneMark, Taipei, Taiwan) 進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，使用引子對：CoryITS-f1 (5’-GGCCTCGCCCCCTTCGAGAT-3’), CoryITS-r1 (5’-CCGACCCGCAGCCACTTCAG-3’) (Mmbaga *et al*. 2015)，增幅核醣體核酸基因 (rDNA) 的內轉錄區 internal transcribed spacer (ITS) 片段。PCR 產物委託源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 進行定序。CC-2 與 CC-3 菌株之 ITS 序列定序結果與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 之資料庫進行比對分析。

羅勒枝枯病分離株之病原性測定

將自羅勒枝枯病分離菌株 CC-2，CC-3 單孢培養於 PDA 平板上，於 25℃下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 28 d 後，以無菌水洗下分生孢子，製成孢子懸浮液 (3×10^5 spores mL^{-1})，對具有 6 片真葉之羅勒植株，OT-42 (紫莖種) 與 OT-43 (綠莖種) 進行接種。接種方法則模擬田間採收羅勒的方式，以 75% 酒精消毒過的剪刀採收羅勒植株嫩梢後，再以塑膠噴瓶噴灑 3 mL 羅勒枝枯病菌的孢子懸浮液/棵於切口位置，待乾燥後置入塑膠袋於室溫下保濕 2 d，每處理 4 重複，以無菌水作為對照組。於接種後逐週觀察並記錄病徵。

溫度對羅勒枝枯病菌菌絲生長與分生孢子發芽之影響

菌絲生長試驗：將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 以單孢培養於 PDA 平板上，於 25℃下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 14 d 後，以火

焰消毒過的打孔器 (直徑 0.7 cm) 切取菌絲塊並置於 PDA 平板中央。分別置於 5、10、15、20、25、30 及 35℃之生長箱中 (12 h 光照、12 h 黑暗)，於培養後第 3、6、10 天測量 CC-2 與 CC-3 菌落直徑，每個處理 3 重複，試驗重複 2 次。

分生孢子發芽試驗：以上述相同的培養條件，將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 培養 28 d，以無菌水洗下 PDA 平板上形成的分生孢子，製成孢子懸浮液 (5×10^4 spores mL^{-1})。取出 10 μL 孢子懸浮液滴在滅菌過的載玻片上，再將載玻片保濕於滅菌過的玻璃培養皿中，分別置於 5、10、15、20、25、30 及 35℃之生長箱中。於 15 h 後取出於光學顯微鏡下觀察分孢子發芽情形，每個處理 3 重複，試驗重複 2 次。

溫度對羅勒枝枯病發生之影響

將羅勒枝枯病菌 CC-3 以上述接種方式處理羅勒 OT-42 品系植株，於接種後分別置於 20、25 及 30℃之生長箱中 (12 h 光照、12 h 黑暗)，待接種 2 d 後拆套袋，以無菌水作為對照組，每處理 3 重複。於接種後每週觀察並記錄病害發展之嚴重度。個別植株的罹病指數 (disease index) 分為 0–3 級：0 級為健康；1 級為植株具有 1–30% 罹病組織；2 級為植株具有 31–60% 罹病組織；3 級為植株具有 60% 以上罹病組織或植株死亡。依下列公式計算出罹病度：

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{n_0 \times 0 + n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3}{N \times 3} \times 100$$

n_i 為 i 級棵數，N 為總棵數，本試驗重複 2 次。

室內測試藥劑對羅勒枝枯病菌菌絲生長之影響

植物保護資訊系統中，推薦防治小葉菜類葉斑病之殺菌劑如下所述：75% 四氯異苯腈可濕性粉劑 700×、10% 保粒黴素 (甲) 可濕性粉劑 1,000×、50% 依普同可濕性粉劑 1,000× 及 44.2% 克收欣水懸劑 2,500×。將上述藥劑以 1、10 及 100 μg mL^{-1} 的濃度，倒入滅菌後溫度降至 50–60℃的 PDA 中搖晃均勻，製成平板。將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 以單孢培養於 PDA 平板上，於 25℃下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 14 d 後，以火焰消毒過的打孔器 (直徑 0.7 cm) 切取菌絲塊後，置於含有藥劑的 PDA 平板中央與沒有藥劑的 PDA 平板中央 (對照組)。培養於 25℃ 之生長箱中 (12 h 光照、12 h 黑暗)，於培養後第 3、6、10 天測量 CC-2 與 CC-3 菌落直徑，依下列公式計算出菌絲生長抑制率：

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Diameter of CK} - \text{Diameter of treatment}}{\text{Diameter of CK}} \times 100$$

每個處理 4 重複，試驗重複 2 次。

統計分析

各項處理之試驗結果資料利用 IBM SPSS Statistics 20.0 版統計分析軟體，先進行單因子獨立變異數分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以 Tukey's honestly significant difference (HSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

結果

羅勒枝枯病之病徵

於屏東市萬丹鄉與路竹鄉的羅勒栽培區，農民以剪刀或採茶機採收羅勒嫩梢與葉片。在採收數日後具有傷口的羅勒枝條呈現黑褐色枯枝病徵 (dieback)。發病初期由傷口處開始失水乾枯，莖部組織逐漸形成黑褐色縊縮狀病斑 (圖 1A)。隨著病程發展，壞疽狀病徵往下蔓延。於發病後期，全株乾枯死亡。於 2019–2020 年高屏地區冬季的羅勒栽培期，進行田間調查與罹病樣本採集，於露天栽培區之分離率為 27%，溫室栽培區之分離率為 90%。

羅勒枝枯病菌之形態與分子生物鑑定

從田間採集的罹病樣本，經由植物組織切片後，以光學顯微鏡觀察。於罹病組織周

圍發現羅勒枝枯病菌的分生孢子與產孢梗 (圖 1B)。分生孢子的型態為倒棍棒狀或梭形，無色或淡褐色，一端具有明顯突出的深褐色脫落疤痕 (basal scar)，具 3–11 個隔膜，散布於分生孢子梗周圍。分生孢子梗 (conidiophore) 為褐色、略為彎曲狀，單一生長無分叉，基部膨大呈球狀，具 5–10 個隔膜。田間採集的罹病樣本經組織分離後，於 PDA 平板上培養 7 d，觀察其菌落型態。羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 之菌落邊緣為白色至淺灰色，中央為深橄欖綠色 (圖 1C)。使用火焰滅菌過的移植針，挑取菌株 CC-2 的菌絲與分生孢子鏡檢，測量菌株 CC-2 分生孢子的平均長度與寬度為 34–265 μm × 10–15 μm，分生孢子梗為 155–603 μm × 5–7 μm。分生孢子以串生的方式從分生孢子梗產孢，分生孢子於串生時，孢子的尾部與另一個孢子的頂端以泡狀構造 (bulbous swollen tips) 連接 (圖 1D)。以分子生物學鑑定羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3，將上述菌株的 ITS 序列與 NCBI 基因資料庫進行比對。結果顯示，菌株 CC-2 與 CC-3 與 *C. cassiicola* 菌株 KACC48898、SL37 與 LC001 之 ITS 序列 (MN871697.1、MN837905.1 及 MN393242.1) 相比之相同度 (identity) 為 100%。依據病害的病徵、病原菌型態特徵及分子生物學鑑定結果，證明由羅勒枝枯病罹病組織分離出的病原菌為 *C. cassiicola* (Mmbaga *et al*. 2015; Pereira *et al*. 2019; Chang *et al*. 2020)。

羅勒枝枯病分離株之病原性測定

利用噴霧接種將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 之分生孢子懸浮液接種於羅勒植株之嫩梢切口，以確認其病原性。在接種後第 7 天，於羅勒枝條傷口處出現黑褐色縊縮狀病斑，於葉片出現針狀黑褐色病斑。在接種後第 14 天，發現黑褐色縊縮狀病斑往枝條下方蔓延 (圖 1E)，葉片上的黑褐色病斑亦逐漸擴大 (圖 1F)。於接種 30 d 後，出現落葉、枝條乾枯且植株死亡的現象。在接種後第 14 天，分離羅勒枝條與葉片的罹病組織與健康組織交界處，確認造成發病的病原菌為原接種病原菌，其菌落形態、分生孢子型態特徵及產孢特徵均相同，完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)，確認 *C. cassiicola* CC-2 與 CC-3，2 菌株均對羅勒均具有病原性。菌株 CC-2 接種於 OT-42 (紫莖種) 與 OT-43 (綠莖種)，於接種後第 14 天觀察其罹病率分別為 25% 與 6.25%；菌株 CC-3 接種於 OT-42 與 OT-43，於接種後第 14 天觀察其罹病率分別為 43.75% 與 6.25%，顯示紫莖種之羅勒對此病原菌之感受性較高。

溫度對羅勒枝枯病菌菌絲生長與分生孢子發芽之影響

將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 菌絲塊培養在 5、10、15、20、25、30 及 35℃生長箱中，於培養第 10 天發現 2 菌株的菌絲生長溫度範圍為 15–35℃ (圖 2)。在 5–25℃的環境下菌絲生長速度受溫度上升而增加，於 25℃生長箱中有最快生長速率，在 25–35℃生長箱中菌絲生長速度則隨溫度上升而下降。在羅勒枝枯病菌受溫度影響分生孢子發芽的試驗中，將菌株 CC-2 與 CC-3 之分生孢子以無菌水洗下後，置於不同溫度生長箱中，於洗下後第 15 小時計算發芽率。發現 2 菌株分生孢子發芽溫度範圍為 10–35℃。在 20–35℃下，菌株 CC-2 之孢子發芽率達 80% 以上；在 15–35℃菌株 CC-3 之孢子發芽率可高達 90% 以上。然而，在低於 15℃的環境均不利 2 菌株之分生孢子發芽 (圖 3)。

溫度對羅勒枝枯病發生之影響

將羅勒 OT-42 品系植株製造傷口後，噴霧接種菌株 CC-3 之孢子懸浮液，並套袋保濕於 20、25 及 30℃之生長箱中。在接種後 2 d 拆袋，第 7 天觀察植株發病情形。結果發現於 20、25 及 30℃生長箱中，羅勒枝枯病的罹病度分別為 16.67、75 及 16.67% (圖 4)。

室內測試藥劑對羅勒枝枯病菌菌絲生長之影響

將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 菌絲塊，培養在含有 1、10 及 100 μg mL^{-1} 四氯異苯腈、保粒黴素 (甲)、依普同及克收欣的 PDA 平板 (25℃、12 h 光照、12 h 黑暗)。於培養後第 10 天，發現 1、10 及 100 μg mL^{-1} 依普同對 CC-2、CC-3 有最佳的菌絲生長抑制率分別為

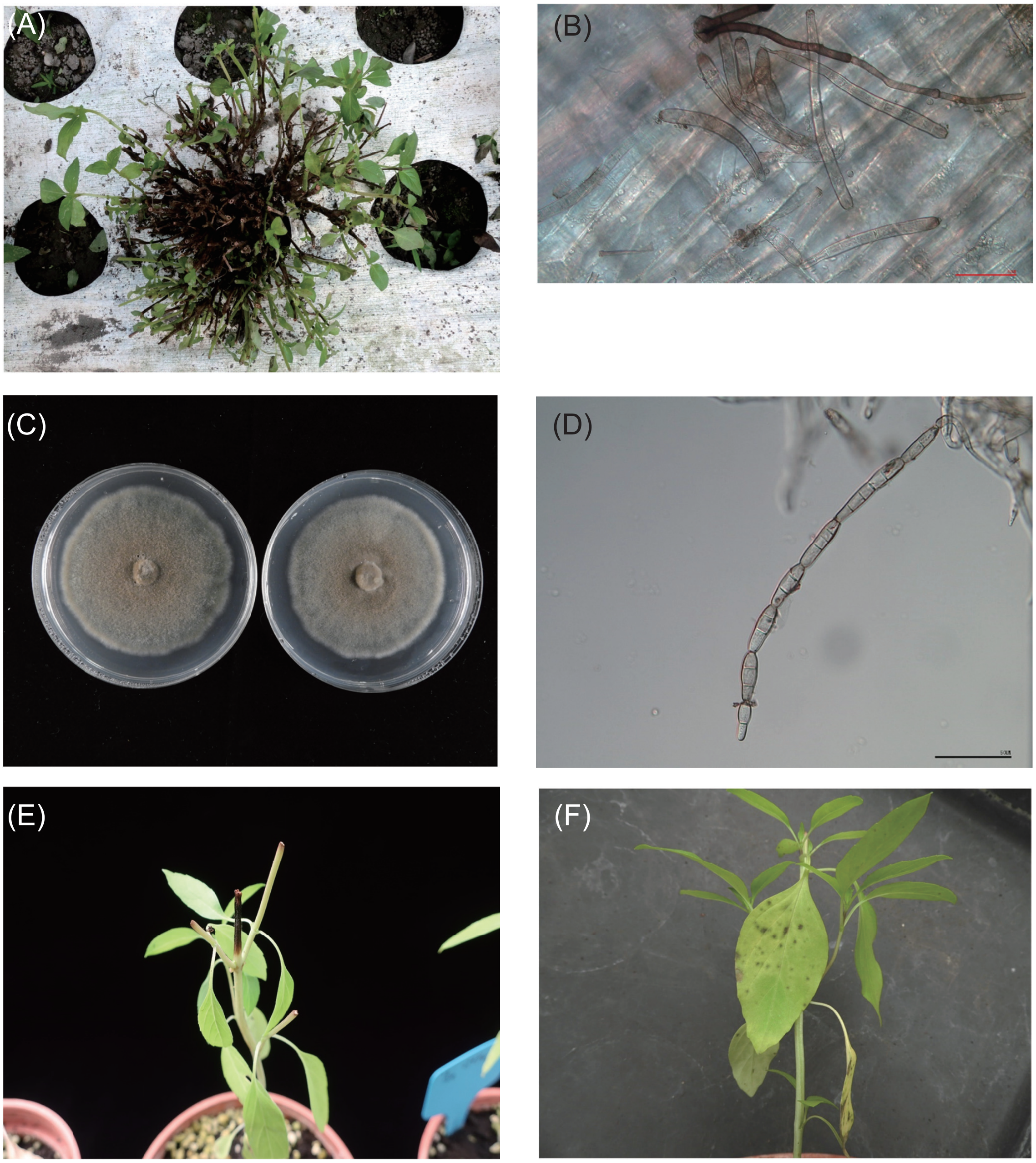


圖 1. 由 *Corynespora cassiicola* 引起之羅勒枝枯病的病徵與羅勒枝枯病菌之菌落、孢子形態特徵。(A) 田間病徵；(B) 罹病莖部組織切片上 *C. cassiicola* 之分生孢子與產孢梗；(C) *C. cassiicola* 於 25℃ 定溫箱中 PDA 培養基上培養 14 d 的菌落形態；(D) 分生孢子以串生方式產孢；(E) 病原性測試中 *C. cassiicola* 造成的羅勒莖部病徵；(F) 病原性測試中 *C. cassiicola* 造成的葉部病徵。比例尺 = 50 μm。

Fig. 1. Symptoms of basil dieback disease caused by *Corynespora cassiicola* and its colony, conidia morphology. (A) symptom in the field; (B) conidia and conidiophore of *C. cassiicola* on basil diseased shoot section; (C) colony of *C. cassiicola* grown on potato dextrose agar (PDA) at 25℃ for 14 d; (D) conidia developed in chain; (E) basil shoot symptom caused by *C. cassiicola* in pathogenicity tests; and (F) basil leaf symptom caused by *C. cassiicola* in pathogenicity tests. Bar = 50 μm.

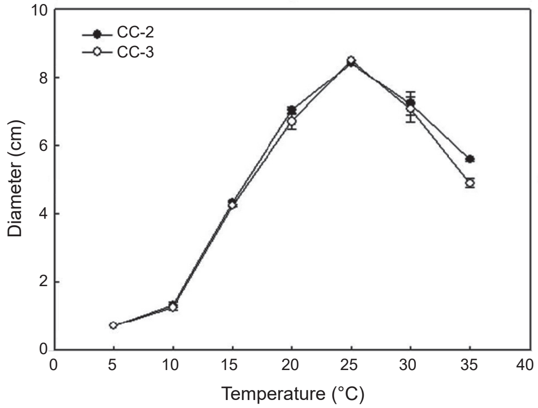


圖 2. 溫度對羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 菌絲生長之影響。

Fig. 2. Effect of temperature on the mycelial growth of *Corynespora cassiicola* CC-2 and CC-3, cultured on potato dextrose agar (PDA) for 10 d.

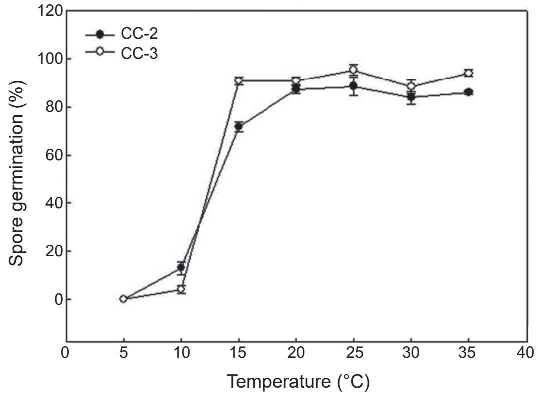


圖 3. 溫度對羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 孢子發芽之影響。

Fig. 3. Effect of temperature on the spore germination of *Corynespora cassiicola* CC-2 and CC-3.

72.9、64.4、77% 與 73.5、64.9、75.4%。克收欣次之，分別為 62.2、66.8、60.7% 與 73.5、64.9、75.4%。保粒黴素 (甲) 分別為 57.7、42.2、45.3% 與 53.7、48.7、50.9%。而四氯異苯腈則為 47.3、49.5、51.6% 與 43.3、44.4、46.3% (表 1、表 2)。

討論

羅勒是台灣主要香草植物之一，於 2019 年 9 月至 2020 年 3 月間陸續於屏東羅勒栽培

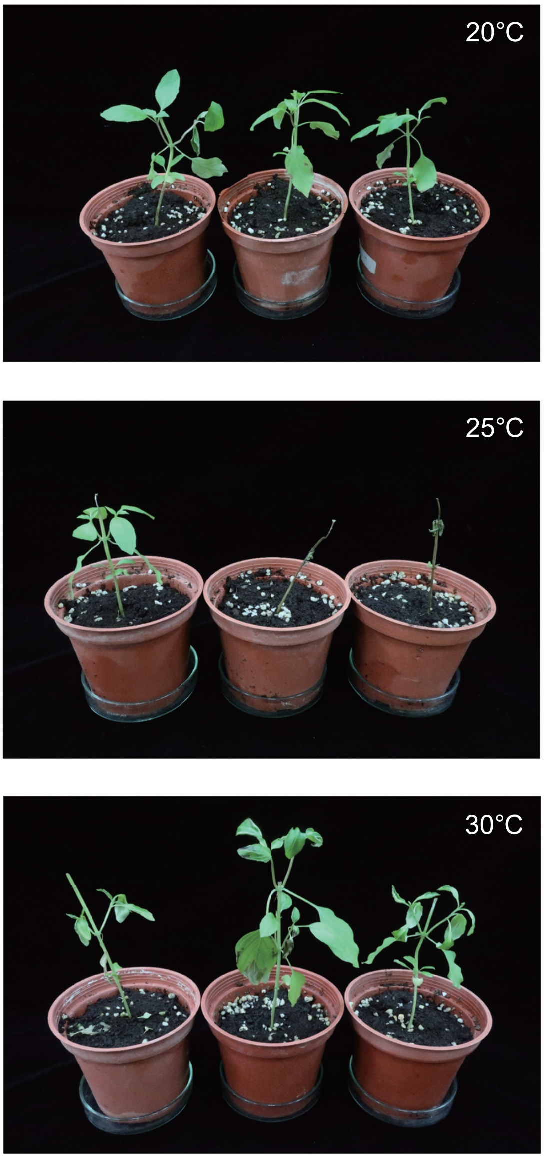


圖 4. 溫度對羅勒枝枯病發生之影響。

Fig. 4. Effect of temperature on the basil dieback disease caused by *Corynespora cassiicola* CC-3 at 7 d after inoculation.

田，發現機械採收羅勒的嫩葉與新梢後數日，於傷口處出現縊縮狀黑褐色壞疽型病徵。於屏東縣田間調查發現，該病害零星發生於羅勒露天栽培區，而溫室栽培區則受病害影響範圍較大，最嚴重者發病率可達 60%。由中央氣象局一年內觀測資料查詢系統 (http://e-service.cwb.

表 1. 室內試驗四氯異苯腈、保粒黴素 (甲)、依普同及克收欣對羅勒枝枯病菌 CC-2 菌絲生長之抑制率 (%)。

Table 1. The inhibitory activity (%) of chlorothalonil, polyoxins, iprodione and kresoxim-methyl on mycelial growth of *Corynespora cassiicola* CC-2.

	Concentration (μg mL^{-1})		
Chemical	1	10	100
Chlorothalonil	47.3 ± 0.96 B[z] d	49.5 ± 0.56 AB b	51.6 ± 0.83 A c
Polyoxins	57.7 ± 2.03 A c	42.2 ± 1.18 B c	45.3 ± 0.93 B d
Iprodione	72.9 ± 3.82 AB a	64.4 ± 0.58 B a	77.0 ± 0.28 A a
Kresoxim-methyl	62.2 ± 1.10 B b	66.8 ± 0.0 A a	60.7 ± 0.92 B b

[z] Data are the means of inhibitory activity (%) form four biological replicas (*N* = 4), which were compared by row and column for the efficacy of same fungicide in different concentrations and the efficacy of different fungicides in same concentration, respectively. Values in each row and column followed by different letters in uppercase and lowercase represent significant differences based on Tukey's honestly significant difference (HSD) test (*P* = 0.05). The statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20.0 version.

表 2. 室內試驗四氯異苯腈、保粒黴素 (甲)、依普同及克收欣對羅勒枝枯病菌 CC-3 菌絲生長之抑制率 (%)。

Table 2. The inhibitory activity (%) of chlorothalonil, polyoxins, iprodione and kresoxim-methyl on mycelial growth of *Corynespora cassiicola* CC-3.

	Concentration (μg mL^{-1})		
Chemical	1	10	100
Chlorothalonil	43.3 ± 0.93 A[z] d	44.4 ± 0.65 A b	46.2 ± 0.67 A d
Polyoxins	53.7 ± 0.82 A c	48.7 ± 2.73 A b	50.9 ± 0.54 A c
Iprodione	73.5 ± 3.04 A a	64.9 ± 0.25 B a	75.4 ± 0.10 A a
Kresoxim-methyl	62.2 ± 1.16 AB b	63.6 ± 0.74 A a	58.8 ± 0.86 B b

[z] Data are the means of inhibitory activity (%) form four biological replicas (*N* = 4), which were compared by row and column for the efficacy of same fungicide in different concentrations and the efficacy of different fungicides in same concentration, respectively. Values in each row and column followed by different letters in uppercase and lowercase represent significant differences based on Tukey's honestly significant difference (HSD) test (*P* = 0.05). The statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20.0 version.

gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp) 中，發現於上述調查時間內，屏東縣萬丹鄉的氣溫約為 20.4–34.6℃，相對濕度約為 70–77%；枋寮鄉的氣溫約為 20.1–31.6℃，相對濕度約為 77–81%。將田間實際溫度與羅勒枝枯病菌最適生長溫度進行比對，發現萬丹鄉與枋寮鄉 9 月份至隔年 3 月份的溫度範圍，適合羅勒枝枯病菌生長。於上述調查期間內，於每日午後 5 點至隔天清晨 7 點前的夜晚時段，上述地點的相對濕度常高達 86% 以上。而農民採收羅勒的時段位於清晨，於適合羅勒枝枯病發展的環境下製造傷口，會促進病原菌入侵感染。由文獻指出，*C. cassiicola* 危害植株的嚴重程度受環境影響甚鉅，於持續性 (16–44 h) 的高濕度環境下嚴重發生 (Pernezny *et al*. 1996; Mackenzie *et al*. 2018)。在日本，由於黃瓜 (cucumber) 常年栽培於溫室中，屬於相對濕度較高的環境，*C. cassiicola* 造成的葉斑病成為黃瓜栽培最大限制因子 (Miyamoto *et al*. 2009; Duan *et al*. 2019)。

於本研究接種實驗發現，*C. cassiicola* 除了造成莖部病徵，也會造成葉部病徵，初期呈現針狀黑褐色小斑，逐漸發展為不規則型黑褐色壞疽斑。在發病後期，葉部壞疽型病斑中央仍為壞疽狀，並無灰白色斑或是同心輪紋出現，可依照此特性與羅勒葉枯病 *A. alternata* 進行區分。唯在田間與溫室調查中，葉部病徵的 *C. cassiicola* 分離率低於莖部病徵，遂將此病害取名為羅勒枝枯病。*C. cassiicola* 為子囊菌門、座囊菌綱、格孢菌目之鐵刀木棒狀桿孢菌。最早於 1868 年，由 Berkeley & Curtis (1868) 發現此病原菌與 *Helminthosporium* spp. 有相

似的形態特徵，將其命名為 *Helminthosporium cassiicola*。隨後 Goh *et al*. (1998) 根據限制性片段長度多態性分析 (restriction fragment length polymorphism; RFLP)，將此菌從 *Helminthosporium* 複合種中區分出來，將其重新命名為 *Corynespora cassiicola*。*C. cassiicola* 可感染橡膠樹、番茄、黃瓜、棉花、菸草、大豆、木瓜、藍莓、番薯等 380 種以上的農作物 (Onesirosan *et al*. 1974; Koenning *et al*. 2006; Garibaldi *et al*. 2007; Schlub *et al*. 2009; Conner *et al*. 2013)，屬於廣寄主性的病原真菌。此病原菌主要以壞疽型寄生 (necrotrophic) 於植體上，藉由分泌毒素影響植株正常生理反應，形成壞疽型病徵。例如分泌 *C. cassiicola* of tomato (CCT) toxin，對番茄植體中具有抑制真菌生長能力的 α-tomatine 進行解毒作用，以利病原菌進行感染與纏據 (Oka *et al*. 2006)。除此之外，可感染橡膠樹之 *C. cassiicola* 菌株，其分泌小分子醣基化蛋-Cassiicolin 的能力與該菌之毒力呈正相關 (Lopez *et al*. 2018)。

C. cassiicola 的寄主範圍廣泛，仍有部分菌株具有寄主專一性。Dixon *et al*. (2009) 藉由分析以下 4 個基因座 (loci)：two random hyper-variable loci (ga4, caa5), actin-encoding locus (act1) 與 ribosomal DNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS)，將 *C. cassicola* 分為 6 種不同基因型的品系 (phylogenetic lineages; PLs)。舉例 PL1 品系的 *C. cassicola* 係具有寄主專一性者，能感染木瓜、胡瓜、豇豆、棉花與羅勒；PL2 品系的 *C. cassicola* 可感染胡瓜與番薯；PL3 品系的 *C. cassicola* 可感染番茄、羅勒與黃瓜；PL4 品系的 *C. cassicola* 可感染胡瓜、豆科、番茄與番薯。本研究中，以柯霍氏法則証明羅勒枝枯病菌之病原性，未來可進行寄主範圍測試與基因分析，進一步釐清此病原菌之菌系。

在植物保護資訊系統中推薦於小葉菜類蔬菜，防治絲狀真菌中不完全菌類的藥劑有：75% 四氯異苯腈 (chlorothalonil) 700×、10% 保粒黴素甲 (polyoxins) 1,000×、23.7% 依普同 (iprodione) 1,000× 及 44.2% 克收欣 (kresoxim-methyl) 2,500×，換算成濃度分別為 1,072、100、237 及 177 μg mL^{-1}。由本研究結果發現 4 種藥劑中，以 100 μg mL^{-1} 依普同對 *C. cassicola* 有最佳的菌絲生長抑制率，分別為 77.07% (CC-2) 與 75.39% (CC-3)。此外，實驗結果顯示四氯異苯腈、保粒黴素甲、依普同及克收欣於 1 μg mL^{-1} 濃度下，菌株 CC-2 與 CC-3 之菌絲生長抑制率分別為 47.3、57.65、72.92、62.15% 與 43.33、53.72、73.52、62.15%。故依照植物保護資訊系統推薦之藥劑及其稀釋倍數使用，可同時防治羅勒葉斑病與枝枯病。在藥劑試驗結果的統計分析中，以依普同為例，二菌株均在該藥劑 1 ppm 下有最高的標準偏差，表示在該濃度下，藥劑的不穩定性高，實驗數據誤差大，無法與 10、100 ppm 形成線性關係。然而在 10、100 ppm 二濃度中，藥效較為穩定。因此，於田間實際施用時，應遵守推薦使用方式與其推薦濃度，勿隨意調整稀釋倍數而影響藥效。

由於 *C. cassicola* 與 *A. alternata* 此二類病原真菌，對殺菌劑的抗藥性屬於高風險族群 (Fungicide Resistance Action Committee 2019)，在防治策略上應特別注意，避免長期連續性使用呼吸作用相關-粒線體電子傳遞複合物Ⅲ細胞色素 bc1 (Qo) 抑制劑類的殺菌劑，如克收欣 (Duan *et al*. 2019)。以綜合防治策略，將推薦藥劑於尚未發病時、發病初期輪流施用，以降低抗藥性菌株之選汰壓力。

引用文獻

Berkeley, M. J. and M. A. Curtis. 1868. Fungi cubenses (Hymenomycetes). J. Linn. Soc., Bot. 10:280–320. doi:10.1111/j.1095-8339.1868.tb00529.x

Bilal, A., N. Jahan, A. Ahmed, S. N. Bilal, S. Habib, and S. Hajra. 2012. Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn- A review. Int. J. Cur. Res. Rev. 4:73–83.

Chang, C. R., H. H. Shih, J. H. Ou, C. Y. Chen, and C. F. Chau. 2020. First report of brown leaf spot on *Lonicera japonica* caused by *Corynespora cassiicola* in Taiwan. Plant Dis. 104:989. doi:10.1094/PDIS-06-19-1214-PDN

Conner, K. N., A. K. Hagan, and L. Zhang. 2013. First report of *Corynespora cassiicola*-incited target spot on cotton in Alabama. Plant Dis. 97:1379. doi:10.1094/PDIS-02-13-0133-PDN

Dixon, L. J., R. L. Schlub, K. Pernezny, and L. E. Datnoff. 2009. Host specialization and phylogenetic di-

versity of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 99:1015–1027. doi:10.1094/PHYTO-99-9-1015

Duan, Y., W. Xin, F. Lu, T. Li, M. Li, J. Wu, J. Wang, and M. Zhou. 2019. Benzimidazole- and QoI-resistance in *Corynespora cassiicola* populations from greenhouse-cultivated cucumber: An emerging problem in China. Pestic. Biochem. Physiol. 153:95–105. doi:10.1016/j.pestbp.2018.11.006

Fungicide Resistance Action Committee. 2019. Pathogen risk list. https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf (visit on 02/27/2020)

Garibaldi, A., S. Rapetti, J. Rossi, and M. L. Gullino. 2007. First report of leaf spot caused by *Corynespora cassiicola* on basil (*Ocimum basilicum*) in Italy. Plant Dis. 91:1361. doi:10.1094/PDIS-91-10-1361B

Goh, T. K., K. D. Hyde, and D. K. L. Lee. 1998. Generic distinction in the *Helminthosporium*-complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. Fungal Divers. 1:85–107.

Koenning, S. R., T. C. Creswell, E. J. Dunphy, E. J. Sikora, and J. D. Mueller. 2006. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. Plant Dis. 90:974. doi:10.1094/PD-90-0974C

Lopez, D., S. Ribeiro, P. Label, B. Fumanal, J. S. Venisse, A. Kohler, R. R. de Oliveira, K. Labutti, A. Lipzen, K. Lail, D. Bauer, R. A. Ohm, K. W. Barry, J. Spatafora, I. V. Grigoriev, F. M. Martin, and V. Pujade-Renaud. 2018. Genome-wide analysis of *Corynespora cassiicola* leaf fall disease putative effectors. Front. Microbiol. 9:276. doi:10.3389/fmicb.2018.00276

Mackenzie, K. J., L. G. Sumabat, K. V. Xavier, and G. E. Vallad. 2018. A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. Plant Health Prog. 19:303–309. doi:10.1094/PHP-05-18-0023-RV

Miyamoto, T., H. Ishii, T. Seko, S. Kobori, and Y. Tomita. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. Plant Pathol. 58:1144–1151. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x

Mmbaga, M. T., M. S. Kim, L. Mackasmiel, and N. B. Klopfenstein. 2015. Differentiation of *Corynespora cassiicola* and *Cercospora* sp. in leaf-spot diseases of *Hydrangea macrophylla* using a PCR-mediated method. Can. J. Plant. Sci. 95:711–717. doi:10.4141/cjps-2014-354

Oka, K., A. Okubo, M. Kodama, and H. Otani. 2006. Detoxification of α-tomatine by tomato pathogens *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola* and its role in infection. J. Gen. Plant Pathol. 72:152–158. doi:10.1007/s10327-005-0262-8

Onesirosan, P. T., D. C. Arny, and R. D. Durbin. 1974. Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 64:1364–1367. doi:10.1094/Phyto-64-1364

Paton, A. and E. Putievsky. 1996. Taxonomic problems and cytotaxonomic relationships between and within varieties of *Ocimum basilicum* and related species (Labiatae). Kew Bull. 51:509–524. doi:10.2307/4117026

Pereira, C. M., S. S. Salcedo, E. de Oliveira Lopes, and R. W. Barreto. 2019. *Corynespora cassiicola* causes leaf spots on sweet basil (*Ocimum basilicum*) in Brazil. Australasian Plant Dis. Notes 14:32. doi:10.1007/s13314-019-0364-3

Pernezny K., L. E. Datnoff, T. Mueller, and J. Collins. 1996. Losses in fresh-market tomato production in Florida due to target spot and bacterial spot and the benefits of protectant fungicides. Plant Dis. 80:559–563.

Schlub, R. L., L. J. Smith, L. E. Datnoff, and K. Pernezny. 2009. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. Acta Hortic. 808:25–28. doi:10.17660/ActaHortic.2009.808.1

Tzeng, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society Press. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)

Corynespora cassiicola Causes Dieback on Basil

Jia-Rong Tang[1,*], Shu-Fen Tsai[2], Szu-Yu Chen[3], and I-Sheng Feng[2]

Abstract

Tang, J. R., S. F. Tsai, S. Y. Chen, and I. S. Feng. 2021. *Corynespora cassiicola* causes dieback on basil. J. Taiwan Agric. Res. 70(3):196–205.

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is a perennial herb belonging to the family lamiaceae, and is commonly cultivated as a condiment or spice in Taiwan. A symptom of dieback appeared on basil planted in the field and greenhouse at Wandan Township, Pingtung Country, and Luzhu Township, Kaohsiung City, Taiwan, during September 2019 to March 2020. The dark brown lesion initiated from the cutting ends made by the regular harvest, then extended progressively, and eventually resulted in the dieback of the branches and defoliation. Conidiophores and conidia characteristics of *Corynespora cassiicola* were observed from diseased tissues. Margin of lesion was excised and sterilized. Hyphae, once emerged from the plant tissue, were transferred from water agar, subcultured on potato dextrose agar (PDA) plates, and incubated at room temperature. The colonies on PDA were white to pale gray in color and dark olive green in the center area. After 25 days incubation, conidia characteristics of *C. cassiicola* were observed at middle of the colony. Genomic DNA was extracted from pure cultures. The internal transcribed spacer (ITS) DNA fragment was amplified by PCR with primer pairs: CoryITS-f1 and CoryITS-r1, and sequenced. ITS sequence was blasted with GenBank on National Center for Biotechnology Information (NCBI). Blast analysis showed that CC-2 and CC-3 had 100% identity to *C. cassiicola*. Necrosis or dieback appeared at seventh day on some inoculated basils, with disease severity being 75% at 25℃, while 16.67% at 20℃ and 30℃. *C. cassiicola* was reisolated from the lesions, thus fulfilling Koch's postulate. The results suggested that the optimal condition for *C. cassiicola* to cause dieback of basil was at 25℃ in high humidity. Fungicides, which recommended on control of leaf spot caused by *Alternaria alternata* were tested and revealed that iprodione effectively inhibited mycelial growth of *C. cassiicola*.

Key words: Basil, Dieback, *Corynespora cassiicola*.

Received: January 27, 2021; Accepted: April 21, 2021.

* Corresponding author, e-mail: jrtang@tari.gov.tw

1 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

2 Technicians, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

3 Project Assistant, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(3):206–216 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202109_70(3).0005

研究報告

以甜瓜原生質體短暫性表現轉殖系統快速評估基因編輯效果

游舜期 [1,*]　王怡雯 [2]　林思妤 [1]　黃慶儀 [3]　林大鈞 [4,*]

摘要

游舜期、王怡雯、林思妤、黃慶儀、林大鈞。2021。以甜瓜原生質體短暫性表現轉殖系統快速評估基因編輯效果。台灣農業研究 70(3):206–216。

常間回文重複序列叢集/Cas9 蛋白質系統 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9; CRISPR/Cas9) 為近年來興起之基因組編輯技術，亦是目前基因功能研究及精準育種課題的重要新興核心工具。對比現行農桿菌法媒介轉形過程所需時間冗長，本研究旨建立基因組編輯系統的快速導入平台，以利進行基因編輯試驗的先期評估。首先，本研究選用葫蘆科之甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 作為主要材料，建立葉片原生質體短暫性表現系統平台，其轉殖效率約可達 20%。同時，利用甜瓜真核轉譯起始因子 4E (*eukaryotic translation initiation factors 4E*; *Cm-eIF4E*) 作為標的基因，輔以葉片原生質體短暫性表現系統，進行甜瓜細胞之基因組編輯效應評估。結果顯示，藉由原生質體短暫性表現系統導入可同時表現 2 個不同嚮導 RNA (guide RNA; gRNA) 之基因編輯載體，並針對 *Cm-eIF4E* 基因編輯區域進行 polymerase chain reaction (PCR) 擴增及膠體電泳分析，即可快速區分基因組編輯造成之 135 bp 片段缺失的編輯效果。相較導入單一嚮導 RNA 進行基因組編輯所產生之少數幾個鹼基之缺失或插入，需要 TA 選殖及定序以進行基因組編輯分析，可大幅減少實驗所需人力、時間及經費。本研究所建立之甜瓜原生質體短暫性表現轉殖系統，除了可快速分析嚮導 RNA 對甜瓜目標基因之影響效果，亦可作為後續建立甜瓜原生質體轉殖再生平台的重要基礎，進而可作為日後甜瓜精準育種之應用。

關鍵詞：原生質體、基因組編輯、嚮導 RNA、甜瓜真核轉譯起始因子 4E。

前言

近年來氣候變遷造成之環境劇變，耐生物及非生物逆境之作物需求逐年攀升，為因應此種狀況，可精準、快速及創新育種是目前重要的研究方向及課題。常間回文重複序列叢集/Cas9 蛋白質系統 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9; CRISPR/Cas9) 基因組編輯技術是近年來討論度最高、可精準調控基因功能，且相較以往生物技術之操作簡易及便宜，甚至無需引種即可創造新種質，對於快速氣候變遷及極端氣候因應來說，無疑是現行新世代育種技術中最佳利器之一。

CRISPR/Cas9 主要由嚮導 RNA (guide RNA; gRNA，或稱單一嚮導 RNA，single guide RNA; sgRNA) 及 Cas9 蛋白質所組成。CRISPR 序列最早由 Ishino *et al*. (1987) 在大腸桿菌中發現 (Ishino *et al*. 1987)，真正作用機制及應用則是近 10 年才逐漸明瞭。目前已知 CRISPR 基因座在細菌中扮演抵禦噬菌體之角色，其基因座含括 CRISPR 序列及 Cas 蛋白基因，分別轉錄 crRNA 前驅物 (preCRISPR RNA)、trans-activating RNA (tracrRNA) 及轉譯 (translation) 出 Cas 蛋白質。成熟型 crRNA 會與 tracrRNA 及 Cas 蛋白質形成具有功能的 crRNA-tracrRNA-

投稿日期：2021 年 3 月 22 日；接受日期：2021 年 6 月 2 日。
* 通訊作者：yousc_1@tari.gov.tw; dagin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

Cas 複合體，當噬菌體侵入至細胞內，則會藉由特定 crRNA 辨識噬菌體 DNA，並引導活化態 Cas 核酸酶造成噬菌體 DNA 斷裂，而達到防禦效果。為了簡化原核生物crRNA及tracrRNA功能後續應用，Jinek *et al*. (2012) 發表利用連接環 (linker loop) 將 crRNA 及 tracrRNA 連結在一起形成 gRNA，並證實其功能與 crRNA-tracrRNA 相同，也因此簡化 CRISPR/Cas9 基因編輯工具。而真正可利用 CRISPR/Cas9 系統在真核生物上則是在 2013 年由美國 3 個團隊發表的文獻中證實 (Cong *et al*. 2013; Jinek *et al*. 2013; Mali *et al*. 2013)。

現行操作上，gRNA 設計方式和目標序列挑選結果，將影響後續基因組編輯精準度及脫靶 (off-target) 程度，更甚者影響最終外表型之分析。前人研究報告指出導入單一 gRNA 進行基因編輯可獲得不同多種突變結果，舉如：鹼基插入 (insertion)、缺失 (deletion)、置換 (replacement) 或複合 (combined) 型式；此 4 種形式結果以單一鹼基改變占有極大比率 (在阿拉伯芥、油菜及番茄分別占比為 65.9、51.0 及 40.9%)，超出 10 個鹼基改變相對較低，大片段缺失 (100 以上鹼基缺失) 出現機率更低 (Feng *et al*. 2014; Yang *et al*. 2017; Zhang *et al*. 2020)。單一鹼基之插入或缺失會造成終止密碼子提早出現 (premature termination/stop codon) 或框移突變 (frameshift mutation) 進而使胺基酸轉錄及轉譯發生錯誤，致使原先多肽或蛋白質無法正常表現而達到基因剔除 (knock out) 效果。然而，單一 gRNA 之基因編輯仍有一定機率會以 3 的倍數改變鹼基或鹼基置換，產生意義錯誤密碼 (missense codon) 或同義突變 (synonymous mutation)，此狀況仍可能產生單一胺基酸變異或轉譯出具正常功能的多肽或蛋白質，故極有可能導致基因組編輯失敗。現行技術獲得基因組編輯穩定轉殖植物，需經過農桿菌或基因槍轉殖及再生過程，其所需時間、人力及經費甚鉅。倘若能建立一基因組編輯系統的快速導入平台，將可有效先期評估基因組編輯系統。此外，農桿菌媒介轉形導入基因編輯系統，較難在 T_0 及 T_1 世代之篩選出同質突變體 (homogeneous mutation)，需要經過自交或回交至較高世代，方有機會選拔出所需的穩定基因編輯轉殖系，以進行基因功能的研究。利用原生質體短暫性表現轉殖系統快速進行基因編輯評估，在短時間將可有效地進行不同 gRNA 之基因編輯評估，且無需建立無菌組織培養系統，此平台對於前期試驗評估將有莫大幫助 (Lin *et al*. 2018; Meng *et al*. 2020; Wu *et al*. 2020)。爰此，本研究針對單一外顯子同時導入 2 個不同 gRNA 可精準造成 135 鹼基對缺失，並利用單一原生質體 (single protoplast) 細胞搭配巢式 PCR (nested polymerase chain reaction) 分析快速評估轉殖效率，可有效地快速評估並分析基因編輯結果。

材料與方法

試驗材料

本試驗選用葫蘆科 (*Cucurbitaceae*) 之甜瓜 (*Cucumis melo*) 作為材料，試驗品種為 IRAN-H。作物之栽培係將種子播種於含泥炭土之 3 寸育苗盆中，種子播種後 1–2 d 可觀察到胚根突出。播種約 1–2 wk 後，植株生長至本葉 2–3 枚時，即可定植於栽培盆。

原生質體分離

甜瓜葉片以刀片切成約 0.5−1.0 mm 絲狀，置入新鮮配置之酵素溶液 (20 mM MES + 0.4 M mannitol + 20 mM KCl + 1% cellulase R10 + 0.25% macerozyme R10 + 10 mM $CaCl_2$ + 0.1% BSA) 中，於 25℃、水平震盪 40 rpm，反應 12–16 h。經過酵素分解之殘體經過 100 目網篩過濾後，溶液以 100× *g* 離心 3 min，去除上清液後，沉澱物加入 wash solution (WS) 緩衝液 (4.405 g L^{-1} MS + 0.4 M D-mannitol + 0.1 M glycine + 0.51 mM MES) 清洗 2 次。加入 floating solution (FS)溶液 (4.405 g L^{-1} MS + 0.6 M sucrose + 0.1 M glycine + 0.51 mM MES) 均勻混合後，以 65× *g* 離心 10 min，緩慢吸取最上層之分層至新離心管。加入兩倍體積之 0.5 M sorbitol 溶液，均勻混合，再以 100× *g* 離心 3 min，去除上清液後，混合新的 0.5 M sorbitol 後，以血球計數器 (0650030, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) 推算原生質體數量。

原生質體短暫性轉殖

計數原生質體數量後，調整濃度為 2−5 × 10^5 µL^{-1} 個原生質體，調整後之 0.4 mL 原生質體溶液與一定量之 DNA (1 µg µL^{-1}) 和 0.3 mL polyethylene glycol (PEG) 溶液 (40% PEG 6,000 + 0.25 M glucose + 0.1 M glycine + 0.1 M $CaCl_2$・$2H_2O$) 均勻混合。於室溫反應 15 min 後，緩慢地與 3 mL mW5 溶液 (2 mM MES + 154 mM NaCl + 125 mM $CaCl_2$ + 5 mM KCl + 5 mM glucose) 均勻混合，再以 100× *g* 離心 1 min。去除上清液後，加入新的 mW5 溶液均勻混合，即可移至 24 well 培養盤，經過 24−48 h 後進行轉殖效率評估。

基因表現載體系統之構築

綠色螢光基因表現載體 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP 由農業試驗所生物技術組分子遺傳實驗室所提供。基因編輯載體為利用 CRISPR-direct (https://crispr.dbcls.jp) 網站評估 *Cm-eIF4E* 基因序列 (MELO3C002698.2)，並從中挑選兩個目標序列 dual gRNA (+)_195–217 (5’-TTCGATGAAAGCTACATCGG-3’) 及 dual gRNA (-)_341–363 (5’-TAGTGCATCAGCCTCACCCT-3’)。以此設計構築引子 F1_BsaI + tRNA (5’-taGGTCTCAGGCAACAAAGCACCAGTG-3’)、R1_tRNA + gRNA1 (5’-taGGTCTCAGCTTTCATCGAATGCACCAGCCGGG-3’)、F2_gRNA1 + scaffold (5’-taGGTCTCCAAGCTACATCGGGTTTTAGAGCTAGAA-3’) 及 R2_ BsaI + gRNA2 + tRNA (5’-taGGTCTCCAAACTAGTGCATCAGCCTCACCCTTGCACCAGCCGGG-3’)，再利用合成之 pre-tRNA 序列 (5’-AACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTGGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTCGATTCCCGGCTGGTGCA-3’) 為模板股，以 98℃ 2.5 min，98℃ 10 s、55℃ 20 s、72℃ 15 s 循環 30 次，72℃ 7 min，擴增出 P1 及 P2 片段。P1 及 P2 之 PCR 產物藉由 QIAquick Gel Extraction Kit (28706, Qiagen, Hilden, Germany) 進行去鹽純化，純化所得片段則利用 Golden Gate Assembly (E1601, NEB, Ipswich, MA, USA) 套組構築至 pRGEB32 (#63142, Addgene, Watertown, MA, USA) 載體 (Xie *et al*. 2015)，並定序確認構築序列無誤後，命名此載體為 pRGEB32 [Cm-eIF4E] [dual gRNA]。

綠色螢光基因表現分析

利用原生質體短暫性轉殖系統轉染 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP 綠色螢光基因表現載體至原生質體，並培養 24 h 後。原生質體溶液以 100 體溶液離心 1 min，移除上清液，加入新的 50 µL mW5 溶液混勻，取 20 µL 至玻片，並以正立螢光顯微鏡 (Axioskop 2 plus, Zeiss, Oberkochen, Germany) 觀察及估算綠色螢光基因表現情形。

單一原生質體分離及目標序列編輯結果分析

單一原生質體分離及基因編輯結果分析方法參考 Lin *et al*. (2018) 發表之文獻加以調整。原生質體短暫性轉殖且培養 48 h 後，利用血球計數器推估數量後，利用 mW5 溶液調整濃度為 1 cell µL^{-1}。取 1 µL 調整後之原生質體溶液 (以顯微鏡確認溶液中含有 1 個原生質體細胞) 加入至 PCR 溶液中進行巢式 PCR，第一次片段擴增反應引子為 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_F2 (5’-TGTACCACAAAAGGCCGACT-3’) 及 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_R2 (5’-ACATTCAAGACCCACGACAAGA-3’) 引子，第二次引子為 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_F1 (5’-CTCTCCATTCCACAAAGCAC-3’) 及 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_R1 (5’-GCCCTCACATTCATAATCCC-3’) 引子，兩次 PCR 條件以 98℃、2 min，98℃、10 s，55℃、30 s，72℃、1 min 循環 30 次，72℃、10 min 進行目標片段擴增，PCR 產物以 6% 聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel) 在 0.5× tris-borate-edta (TBE) 溶液 100 V、70 min 條件下進行膠體電泳。核酸電泳後，經 ethidium bromide (EtBr) 染色，再藉由 ultraviolet (UV) 燈箱及膠體照相系統擷取影像。

原生質體基因組 DNA 萃取及基因編輯產物分析

原生質體短暫性轉殖經過 48 h 培養後，以

100× *g* 離心 2 min，去除上清液後，利用植物基因組萃取套組 (FAPGK001, Favorgen, Ping-Tung, Taiwan) 萃取基因組 DNA。萃取之基因組 DNA，利用 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_F1 和 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_R1 引子及 Ex Taq 聚合酶酵素套組 (RR001A, TaKaRa, Shiga, Japan) 擴增目標片段後，以 1.5% agarose 膠片分析。膠體電泳分離之目標片段條帶，以膠體回收套組 (28706, Qiagen, Hilden, Germany) 進行 PCR 目標產物純化，並以 TA 選殖套組 (45-0030, Invitrogen, Waltham, MA, USA) 將純化之 PCR 產物選殖入 TOPO 載體，再進行核酸定序及多重序列比對分析 (multiple sequence alignment) 結果。

統計分析

本研究之試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 套裝統計分析軟體進行變異數分析 (analysis of variance)，倘若處理間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)，則利用最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 進行各處理間之平均值差異性比較。

結果

原生質體製備最佳化及外源 DNA 含量對短暫原生質體轉殖效率影響

為利用原生質體短暫性轉殖表現系統 (圖 1) 進行 CRISPR/Cas9 基因編輯結果評估，原生質體轉殖效率將影響後續評估結果。在低轉殖率情況下，轉殖成功之原生質體數量低，可取得之轉殖成功樣本數不僅低，亦難以代表整體基因編輯結果。所以，為評估甜瓜原生質體短暫性表現及基因編輯效果，本實驗利用研究室先前所構築之兔海葵 (*Zoanthus* sp.) 綠色螢光報導基因載體 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP (圖 2A) 進行轉殖效率評估，並構築可同時表現兩個不同 gRNA 之 pRGEB32 [Cm-eIF4E] [dual gRNA] 載體 (圖 2B) 以進行後續基因編輯評估。

前人研究報告指出，PEG 轉殖過程控制原生質體在 $2-5 \times 10^5$ 個數量，有較佳之轉殖效率 (Huang *et al*. 2013; Burris *et al*. 2016)。為評估單次轉殖可取得最佳原生質體濃度所需之鮮葉重，不同鮮葉重取得純化後之原生質體溶液，經血球計數器估算結果顯示，單次轉殖所需之原生質體數概估需要 0.2 g 新鮮葉片重 (圖 3A)，後續原生質體轉殖實驗亦以此條件獲取所需之鮮葉重。在控制特定原生質體濃度下，PEG 轉殖效率隨著加入之載體 DNA 含量提升，轉殖率從 5% 提升至 20%，並以添加 20−30 μg 載體量具有較佳之表現效率 (圖 3B)；利用倒立螢光顯微鏡觀察原生質體外觀，多數呈現圓形之正常型態，且觀察到螢光反應表現 (圖 4)。然而，當添加之載體 DNA 含量提高至 40 μg，轉殖效果反而降低，顯示過高 DNA 含量對原生質體轉殖有不利影響，故在基因編輯評估實驗將以 20−25 μg 作為加入外源載體之含量基準。

同時導入兩個不同 gRNA 至原生質體針對 *Cm-eIF4E* 基因編輯結果評估

本研究之 gRNA 選擇為透過 *CRISPRdirect* 網站針對 *Cm-eIF4E* 基因序列 (MELO3C002698.2) 進行評估，選擇之目標序列皆位於 *Cm-eIF4E* 基因第一個外顯子區段 (exon 1)，第一個目標序列位於起始位置起算第 15–37 個鹼基對 [含 protospacer adjacent motif (PAM) 序列] 之正股 (plus/sense strand)，第二個則是第 161–183 個鹼基對 (含 PAM 序列) 之負股 (minus/antisense strand)，預期同時導入兩個不同位點之 gRNA 可造成目標序列 135 bp 缺失。為快速分析同時導入兩個不同 gRNA 造成之染色體片段缺失，針對 *Cm-eIF4E* 基因第一個外顯子區段設計兩組引子 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_F2/Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_R2 及 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_F1/Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_R1，擴增片段之 PCR 產物分別預期可獲得 732 bp 及 564 bp 條帶；若發生基因編輯產生之 135 bp 缺失，則第二組引子擴增之 PCR 產物將可觀察到 429 bp 條帶 (圖 5A)。為確認本試驗預期結果，利用混合之轉殖原生質體經基因組 DNA 萃取後，以 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_F1 及 Cm-eIF4E (Chr.12)_E1_R1 引子擴增目標片段，並經膠體電泳分析後，觀察到 2 個條帶；無轉殖之葉片及空載體轉殖之原生質體，以相同引子擴增目標片段，則僅觀察到 1 個條帶 (圖 5B)。

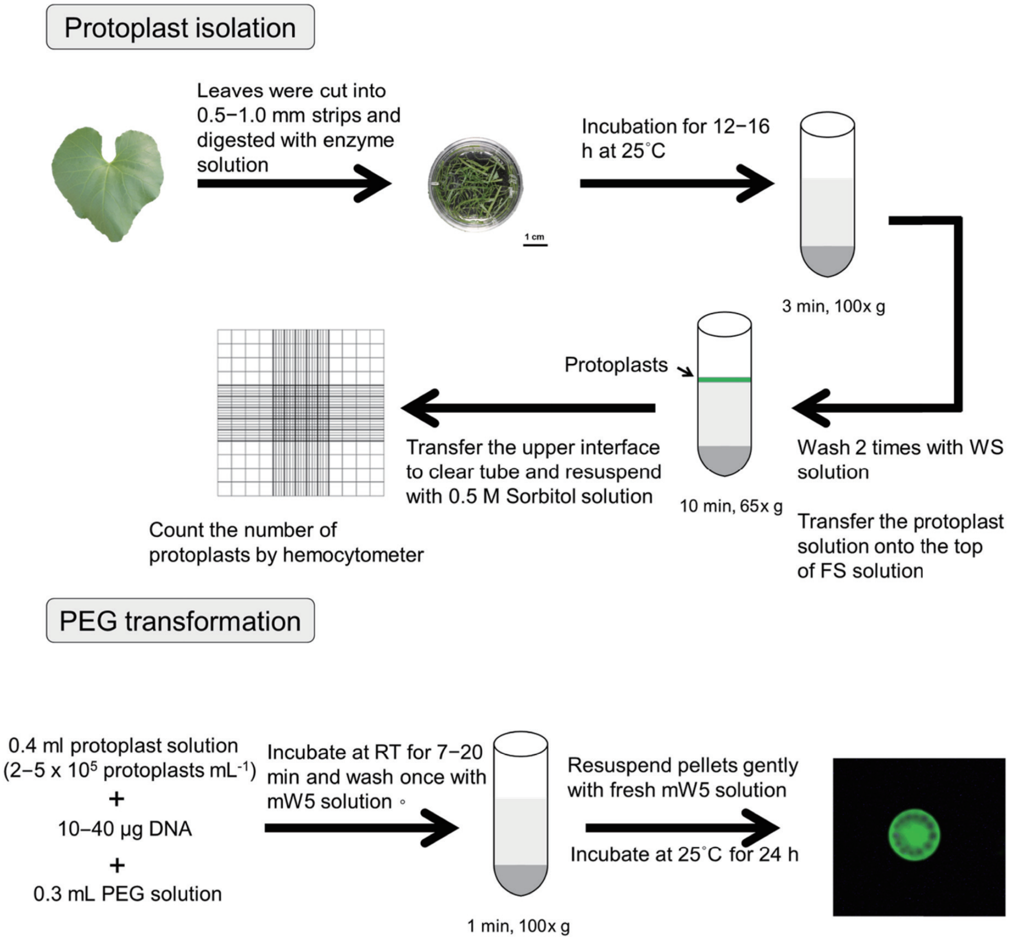


圖 1. 原生質體短暫性表現轉殖流程示意圖。

Fig. 1. Flowchart illustrating steps of transient transfection in melon protoplasts. WS: wash buffer; PEG: polyethylene glycol.

此外，為近一步檢測單一原生質體細胞同時導入兩個不同 gRNA，可對目標基因造成片段缺失及評估基因編輯效率，藉由單一原生質體分離方法及上述兩組引子進行巢式 PCR 分析。結果顯示 20 個原生質體樣本中，11 個樣本能擴增到目標片段，其中僅 1 個樣本 PCR 產物位於 429 bp 附近 (圖 5C)，以此推估本原生質體轉殖系統可獲得 135 bp 片段缺失約 9.1%。為近一步分析本系統原生質體基因編輯結果，將圖 5B 中轉殖原生質體經 PCR 擴增取得 564 bp 及 429 bp 位置之 2 個條帶，分別經過膠體回收、純化及 TA 選殖後，進行核酸定序。定序結果顯示 564 bp 位置之條帶，隨機挑選 8 個樣本中，1 個樣本觀察到 1 個核苷酸插入；429 bp 位置之條帶，隨機挑選 21 個樣本，皆觀察到 135 核苷酸缺失現象，且缺失之位置皆自起始位置起算第 32 到第 166 個核苷酸 (圖 5D)。

討論

植物真核轉譯起始因子 4F 蛋白複合體主導真核生物傳訊RNA (mRNA) 轉譯起始過程，其複合體含括 eIF4E、eIF4G、eIF4A (DEAD-box RNA helicase)、PARP [poly (A)-binding protein] 和 eIF3 蛋白質 (Jackson *et al*. 2010)。在植物抗病毒基因中，針對病毒脅持宿主本身

轉譯資源進行突變或剔除而獲得之抗病毒機制，稱為易感性喪失 (loss-of-susceptibility)，其中 *eIF4E* 和 *eIF4G* 基因對於病毒 RNA 轉譯及複製為主要的關鍵因子，亦是植物病毒主要脅持宿主資源的對象 (Truniger & Aranda 2009; Wang & Krishnaswamy 2012)。在自然種原中，

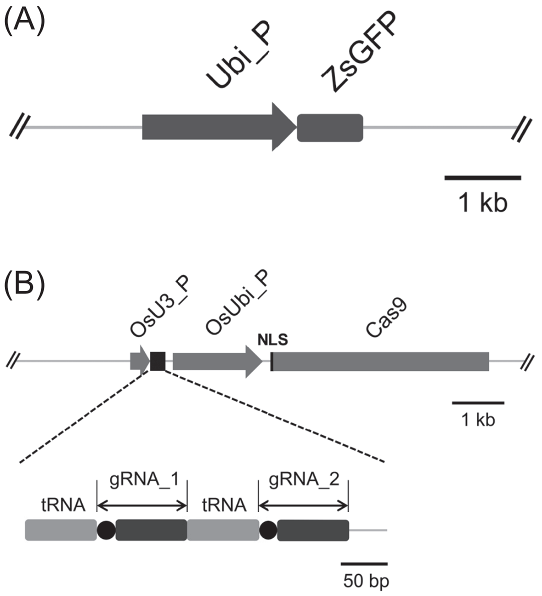


圖 2. 應用於短暫性表現轉殖系統之轉殖載體示意圖。(A) 綠色螢光基因表現載體 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP；(B) *Cm-eIF4E* 基因編輯載體 pRGEB32 [Cm-eIF4E] [dual gRNA]。

Fig. 2. Schematic diagram of the transient expression vectors in this study. (A) *Zoanthus* sp. green fluorescent protein (ZsGFP) expression vector: pCAMBIA-Ubi-ZsGFP; (B) genomic editing vector for *Cm-eIF4E* gene: pRGEB32 [Cm-eIF4E] [dual gRNA]. Ubi_P: maize ubiquitin promoter; OsU3_P: *Oryza sativa* U3 snoRNA promoter; NLS: nuclear localization sequence; OsUbi_P: *Oryza sativa* ubiquitin promoter.

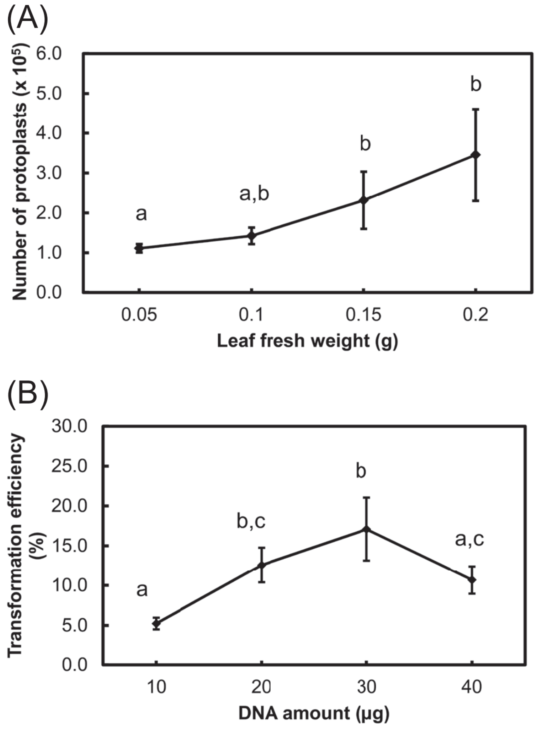


圖 3. 原生質體之分離及短暫表現轉殖效率評估。(A) 不同葉片鮮種可分離原生質體數量 (n = 4)；(B) 加入不同載體 DNA 含量對轉殖效率之影響 (n = 4)。

Fig. 3. Melon protoplast isolation and transient transfection efficiency. (A) Protoplast yields isolated from different leaf fresh weights; (B) effect of DNA concentration on transient transfection efficiency.

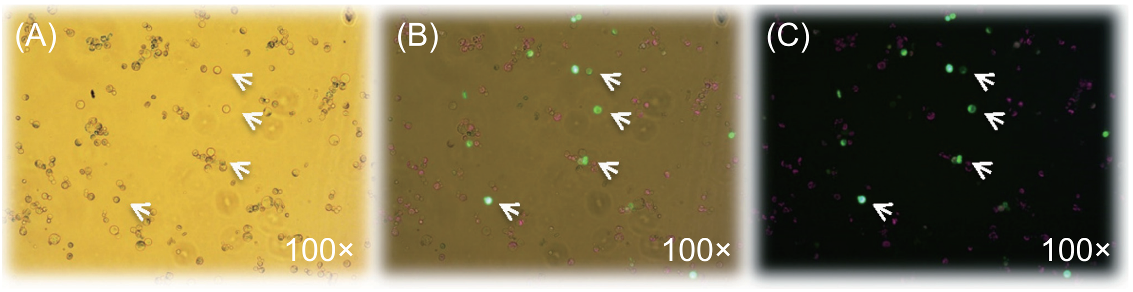


圖 4. 利用螢光顯微鏡觀察甜瓜原生質體轉殖後之外觀形態及螢光蛋白質表現情形。(A) 明視野；(B) 明視野與螢光影像；(C) 螢光影像。

Fig. 4. Morphology and green fluorescent images of protoplast transient transfection. (A) Bright field image; (B) bright field with fluorescent image; and (C) fluorescent image.

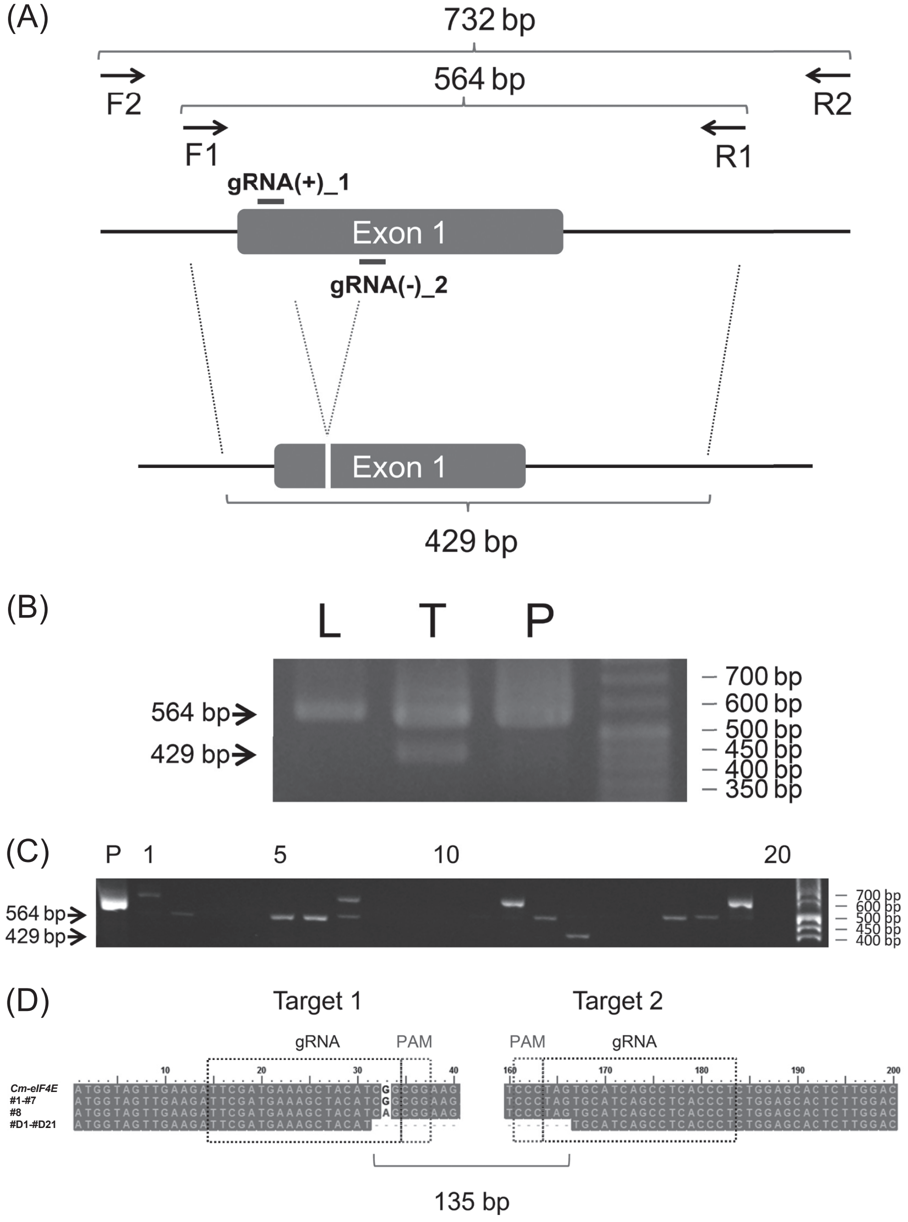


圖 5.　藉由導入兩個鄰近 gRNA，移除特定基因組序列片段。(A) *Cm-eIF4E* 第一個外顯子、gRNA 及引子設計位置簡圖。(B) 導入兩個 gRNA 造成特定片段缺失之結果；L 代表擴增來源為無轉殖之葉片 DNA；T 代表擴增來源為短暫性轉殖表現之原生質體整體表現；P 代表擴增來源為短暫性轉殖空載體 pRGEB32 之原生質體整體表現。(C) 原生質體轉殖後，利用巢式 PCR 擴增單一原生質體 PCR 片段結果圖；P 代表無經過轉殖之原生質體；編號 1–20 代表經過短暫性轉殖表現之單一原生質體結果。(D) 目標片段藉由膠體純化、TA 選殖及定序後以多重序列比對分析結果。

Fig. 5.　135 bp fragment deletion on the *Cm-eIF4E* gene by introducing the dual gRNA vector into protoplasts. (A) Schematic diagram of designed dual gRNA and primers on *Cm-eIF4E* exon 1; (B) target fragment were amplified from wild type leaves (L), transfected (T) and non-transfected (P) protoplasts by using polymerase chain reaction (PCR) assay; (C) DNA from several single protoplasts was amplified by using nested PCR after transfection. P, non-transfected protoplasts; and (D) alignment of sequences of mutated alleles identified from cloned PCR fragments.

eIF4E 基因點突變 (point mutation) 造成編碼序列 (coding sequence) 改變且不影響原本蛋白質功能下，獲得抗病毒功能的種原已在多個作物中被發現，例如：番椒、番茄、萵苣、豌豆及甜瓜 (Ruffel *et al*. 2002; Nicaise *et al*. 2003; Gao *et al*. 2004; Ruffel *et al*. 2005; Nieto *et al*. 2006)；藉由人為導入基因編輯技術，精準地將 eIF4E 或同功型 eIF (iso) 4E 起始因子剔除，可在不影響植物外表型狀況下，獲得抗病毒能力，例如：阿拉伯芥、胡瓜及樹薯 (Chandrasekaran *et al*. 2016; Pyott *et al*. 2016; Gomez *et al*. 2019)。爰此，利用基因編輯技術改造 *eIF4E* 基因功能，在植物抗病毒研究及應用是極有其價值。

然而，現行植物基因編輯技術，需要利用基因轉殖方式將外源片段 CRISPR/Cas9 序列，以農桿菌轉殖或基因槍轉殖導入植物細胞才能進行作用，但由於此兩種方法需要誘導植株再生後，方能分析基因編輯的情形，所需時間短則 3 mo，長則可能需半年以上。對於前期評估基因編輯之試驗目的而言，無法有效快速獲得分析結果。特別在多數無參考序列或解序不完全之非模式植物中，更需要快速且有效的進行前期基因編輯效果及脫靶率評估，以調整目標序列或 gRNA 設計與規劃。

本試驗利用甜瓜葉片為分離原生質體之材料，分離後之原生質體以 PEG 轉殖法導入綠色螢光基因或基因編輯載體，以進行轉殖效率和 *eIF4E* 基因編輯評估。前人研究指出原生質體分離與酵素溶液成分、處理時間及物種材料等有關聯，過與不及將影響原生質體產量及存活率 (Gajdová *et al*. 2007; Huang *et al*. 2013; Burris *et al*. 2016)；本篇原生質體分離處理條件下，每 1.0 g 新鮮葉片重約可獲取 1.7×10^6 個原生質體細胞 (圖 3A)，單次轉殖所需之原生質體數約需要 0.2 g 新鮮葉片。利用 PEG 轉殖平台添加不同含量外源 DNA，對原生質體轉殖效果有不同影響，本試驗結果顯示以添加 20−30 μg 載體量具有較佳之表現效率，但當添加濃度過高時，轉殖效率則逐漸降低 (圖 3B)，在柳枝稷、葡萄及野草莓等植物亦發現有相似狀況 (Burris *et al*. 2016; Zhao *et al*. 2016; Gou *et al*. 2020)。

CRISPR/Cas9 影響目標基因組如前言所述，可能會有鹼基插入、缺失、置換或複合型式，且以單一鹼基改變出現機率較高；單一鹼基的改變在後續篩檢分析上，可以使用 T7 核酸內切酶 (T7 endonuclease I; T7EI)、高解析度熔離分析 (high-resolution melting analysis; HRMA)、sanger 定序或次世代定序等方法進行篩檢 (Germini *et al*. 2018; Manghwar *et al*. 2019)，但這些篩檢方法所需經費及人力不低。因此，本研究同時導入兩個不同 gRNA 可精準造成 135 鹼基對缺失，再利用 PCR 擴增目標區域及膠體電泳分析，即可快速進行篩選，且利用單一原生質體細胞搭配巢式 PCR 和膠體電泳，即可快速估算 135 鹼基對缺失在原生質體中所占比例，將可大幅縮減篩檢所需經費。此外，在本研究中使用之 Cas9 蛋白及 gRNA 之表現分別由水稻 *UBI* 及 *U3* 啟動子 (promoter) 所控制，顯示單子葉水稻之 RNA 聚合酶 III 及 RNA 聚合酶 II 啟動子可正常於雙子葉甜瓜細胞中表現且具有功能，推測單、雙子葉啟動子間有一定序列相似度且部分功能可通用 (Jang *et al*. 2002; Khurana *et al*. 2013; Kumari & Ware 2013; Lin *et al*. 2018)，但為求實驗之精準性，不同植物間啟動子之效用仍建議先行評估。因此，在經費、時間及資源有限之下，利用原生質體短暫性轉殖表現系統，快速進行基因編輯效能之前期研究評估是不可或缺，後續亦可搭配原生質體再生系統獲得轉殖系植株進行外表性狀分析。冀本研究成果提供後續研究專家學者可於前期快速進行基因編輯評估、後續原生質體再生應用及抗病毒基因研究。

引用文獻

Burris, K. P., E. M. Dlugosz, A. G. Collins, C. N. Stewart, Jr., and S. C. Lenaghan. 2016. Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Plant Cell Rep. 35:693–704. doi:10.1007/s00299-015-1913-7

Chandrasekaran, J., M. Brumin, D. Wolf, D. Leibman, C. Klap, M. Pearlsman, A. Sherman, T. Arazi, and A. Gal-On. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Mol. Plant Pathol. 17:1140–1153. doi:10.1111/mpp.12375

Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339:819−823. doi:10.1126/science.1231143

Feng, Z., Y. Mao, N. Xu, B. Zhang, P. Wei, D. L. Yang, Z. Wang, Z. Zhang, R. Zheng, L. Yang, L. Zeng, X. Liu, and J. K. Zhu. 2014. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111:4632−4637. doi:10.1073/pnas.1400822111

Gajdová, J., B. Navrátilová, J. Smolná, and A. Lebeda. 2007. Factors affecting protoplast isolation and cultivation of *Cucumis* spp. J. Appl. Bot. Food Qual. 81:1–6.

Gao, Z., E. Johansen, S. Eyers, C. L. Thomas, T. H. Noel Ellis, and A. J. Maule. 2004. The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. Plant J. 40:376−385. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02215.x

Germini, D., T. Tsfasman, V. V. Zakharova, N. Sjakste, M. Lipinski, and Y. Vassetzky. 2018. A comparison of techniques to evaluate the effectiveness of genome editing. Trends Biotechnol. 36:147–159. doi:10.1016/j.tibtech.2017.10.008

Gomez, M. A., Z. D. Lin, T. Moll, R. D. Chauhan, L. Hayden, K. Renninger, G. Beyene, N. J. Taylor, J. C. Carrington, B. J. Staskawicz, and R. S. Bart. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. Plant Biotechnol. J. 17:421–434. doi:10.1111/pbi.12987

Gou, Y. J., Y. L. Li, P. P. Bi, D. J. Wang, Y. Y. Ma, Y. Hu, H. C. Zhou, Y. Q. Wen, and J. Y. Feng. 2020. Optimization of the protoplast transient expression system for gene functional studies in strawberry (*Fragaria vesca*). Plant Cell, Tissue Organ Cult. 141:41–53. doi:10.1007/s11240-020-01765-x

Huang, H. Y., Z. Y. Wang, J. T. Cheng, W. C. Zhao, X. Li, H. Y. Wang, Z. X. Zhang, and X. L. Sui. 2013. An efficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) protoplast isolation and transient expression system. Sci. Hortic. 150:206–212. doi:10.1016/j.scienta.2012.11.011

Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J. Bacteriol. 169:5429−5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987

Jackson, R. J., C. U. T. Hellen, and T. V. Pestova. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11:113−127. doi:10.1038/nrm2838

Jang, I. C., W. B. Choi, K. H. Lee, S. I. Song, B. H. Nahm, and J. K. Kim. 2002. High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome c gene OsCc1 and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. Plant Physiol. 129:1473–1481. doi:10.1104/pp.002261

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337:816−821. doi:10.1126/science.1225829

Jinek, M., A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma, and J. Doudna. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. Elife 2:e00471. doi:10.7554/eLife.00471

Khurana, N., H. Chauhan, and P. Khurana. 2013. Wheat chloroplast targeted sHSP26 promoter confers heat and abiotic stress inducible expression in transgenic *Arabidopsis* plants. Plos One 8:e54418. doi:10.1371/journal.pone.0054418

Kumari, S. and D. Ware. 2013. Genome-wide computational prediction and analysis of core promoter elements across plant monocots and dicots. Plos One 8:e79011. doi:10.1371/journal.pone.0079011

Lin, C. S., C. T. Hsu, L. H. Yang, L. Y. Lee, J. Y. Fu, Q. W. Cheng, F. H. Wu, H. C. W. Hsiao, Y. Zhang, R. Zhang, W. J. Chang, C. T. Yu, W. Wang, L. J. Liao, S. B. Gelvin, and M. C. Shih. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnol. J. 16:1295−1310. doi:10.1111/pbi.12870

Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339:823−826. doi:10.1126/science.1232033

Manghwar, H., K. Lindsey, X. Zhang, and S. Jin. 2019. CRISPR/Cas system: Recent advances and future prospects for genome editing. Trends Plant Sci. 24:1102–1125. doi:10.1016/j.tplants.2019.09.006

Meng, R., C. Wang, L. Wang, Y. Liu, Q. Zhan, J. Zheng, and J. Li. 2020. An efficient sorghum protoplast assay for transient gene expression and gene editing by CRISPR/Cas9. PeerJ 8:e10077. doi:10.7717/peerj.10077

Nicaise, V., S. German-Retana, R. Sanjuán, M. P. Dubrana, M. Mazier, B. Maisonneuve, T. Candresse, C. Caranta, and O. LeGall. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic vi-

rus. Plant Physiol. 132:1272−1282. doi:10.1104/pp.102.017855

Nieto, C., M. Morales, G. Orjeda, C. Clepet, A. Monfort, B. Sturbois, P. Puigdomènech, M. Pitrat, M. Caboche, C. Dogimont, J. Garcia-Mas, M. A. Aranda, and A. Bendahmane. 2006. An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. Plant J. 48:452−462. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02885.x

Pyott, D. E., E. Sheehan, and A. Molnar. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. Mol. Plant Pathol. 17:1276–1288. doi:10.1111/mpp.12417

Ruffel, S., M. H. Dussault, A. Palloix, B. Moury, A. Bendahmane, C. Robaglia, and C. Caranta. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). Plant J. 32:1067−1075. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01499.x

Ruffel, S., J. L. Gallois, M. L. Lesage, and C. Caranta. 2005. The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. Mol. Genet. Genomics 274:346−353. doi:10.1007/s00438-005-0003-x

Truniger, V. and M. A. Aranda. 2009. Recessive resistance to plant viruses. Adv. Virus Res. 75:119−159. doi:10.1016/S0065-3527(09)07504-6

Wang, A. and S. Krishnaswamy. 2012. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. Mol. Plant Pathol. 13:795−803. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x

Wu, S., H. Zhu, J. Liu, Q. Yang, X. Shao, F. Bi, C. Hu, H. Huo, K. Chen, and G. Yi. 2020. Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana. BMC Plant Biol. 20:425. doi:10.1186/s12870-020-02609-8

Xie, K., B. Minkenberg, and Y. Yang. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112:3570–3575. doi:10.1073/pnas.1420294112

Yang, H., J. J. Wu, T. Tang, K. D. Liu, and C. Dai. 2017. CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. Sci. Rep. 7:7489. doi:10.1038/s41598-017-07871-9

Zhang, N., H. M. Roberts, J. Van Eck, and G. B. Martin. 2020. Generation and molecular characterization of CRISPR/Cas9-induced mutations in 63 immunity-associated genes in tomato reveals specificity and a range of gene modifications. Front. Plant Sci. 11:10. doi:10.3389/fpls.2020.00010

Zhao, F. L., Y. J. Li, Y. Hu, Y. R. Gao, X. W. Zang, Q. Ding, Y. J. Wang, and Y. Q. Wen. 2016. A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 125:43−57. doi:10.1007/s11240-015-0928-7

Using Transient Expression and Transfection System of Melon Protoplasts for Rapid Evaluation of Genome Editing

Shuen-Chi You[1,*], Yi-Wen Wang[2], Ssu-Yu Lin[1], Ching-Yi Huang[3], and Da-Gin Lin[4,*]

Abstract

You, S. C., Y. W. Wang, S. Y. Lin, C. Y. Huang, and D. G. Lin. 2021. Using transient expression and transfection system of melon protoplasts for rapid evaluation of genome editing. J. Taiwan Agric. Res. 70(3):206–216.

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9) system is the most popular strategy for genomic editing technology in recent years, and has been a powerful tool for gene function verification and precision plant breeding. To replace the current time-consuming *Agrobacterium*-mediated method, this study aims to establish a rapid transient expression platform for the preliminary evaluation of genomic editing system. First of all, leaf protoplasts of *Cucumis melo* L. were used to establish the transient gene expression system, and the best transformation efficiency reached approximately 20%. Simultaneously, the melon *eukaryotic translation initiation factors 4E* (*eIF4E*) was used as a target gene to evaluate the genome editing efficiency in the transient expression system. Our results have demonstrated that the dual guide RNA (gRNA) CRISPR/Cas9 system could be introduced to mediate deletion of the genomic DNA fragment (135 bp) on the first exon of *Cm-eIF4E* in the transient expression system. Besides, this deletion could be rapidly detected by using the nested polymerase chain reaction (PCR) and PCR. These methods can significantly reduce the required staffing, time and costly processes in contrast to TA cloning and sequencing analysis for detecting the point mutation induced by using single gRNA CRISPR/Cas9 system. Furthermore, the system established in this study provides a foundation for further progress of the precise new-generation crop breeding platform.

Key words: Protoplast, Genomic editing, Dual gRNA, *Cm-eIF4E*.

Received: March 22, 2021; Accepted: June 2, 2021.

* Corresponding author, e-mail: yousc_1@tari.gov.tw; dagin@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[2] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[3] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[4] Contract Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 70(3):217–229 (2021)
DOI:10.6156/JTAR.202109_70(3).0006 研究報告

台灣南部長豇豆園內薊馬類 (Thysanoptera: Thripidae) 的取樣計畫

賴信順 [1,*] 林鳳琪 [2]

摘要

賴信順、林鳳琪。2021。台灣南部長豇豆園內薊馬類 (Thysanoptera: Thripidae) 的取樣計畫。台灣農業研究 70(3):217–229。

長豇豆 (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*, yardlong bean) 為台灣重要的豆科蔬菜之一，薊馬類 (Thysanoptera: Thripidae) 是長豇豆的主要害蟲。為決定何時噴施農藥，因此需建立長豇豆園內薊馬類的取樣計畫，以掌握施藥防治薊馬的時機。本研究調查台灣南部長豇豆園中長豇豆花朵內的薊馬種類為豆花薊馬 [*Megalurothrips usitatus* (Bagnall)] 與台灣花薊馬 [*Frankliniella intonsa* (Trybom)]。在美濃地區以豆花薊馬為優勢種，而在里港地區則是以台灣花薊馬為優勢種。測試長豇豆田區內薊馬類的顏色偏好，結果顯示，薊馬偏好藍色黏板，其次是黃色黏板。評估藍色黏板與黃色黏板的誘捕效能，藍色黏板所誘得的蟲數明顯多於黃色黏板，因此藍色黏板可做為長豇豆園內薊馬類的監測工具。以 Taylor's power law 分析 6 處長豇豆園內以黏板所誘集的薊馬成蟲數量，黏板上薊馬類在長豇豆園的空間分布屬於聚集型。估算 6 處長豇豆園內在薊馬管理時所需要的黏板數量，在符合蟲害管理需求下，若以每週每張黏板誘得 30 隻薊馬作為防治時機，6 處長豇豆園僅需懸掛藍色黏板為 4–10 張即具有可信度。綜合而言，長豇豆園內薊馬類取樣計畫以藍色黏板作為工具，能夠監測薊馬的早期入侵，並且掌握施用化學農藥防治薊馬的時機。

關鍵詞：長豇豆、薊馬、顏色偏好、空間分布、樣本數量。

前言

長豇豆 (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*, yardlong bean) 為豆科豇豆屬 (*Vigna*) 的一年生蔓性草本植物，莢長 50–60 cm，呈長筒狀。性喜溫暖及日照充足的氣候，耐熱性強，為台灣各地在夏季皆可栽培的重要蔬菜之一，而長豇豆耐寒性弱，僅台灣南部能全年生產 (Chiu & Lin 2015; Chang *et al*. 2018)。台灣長豇豆田間常見的害蟲有黑豆蚜 (*Aphis craccivora* Koch) 、豆莢螟 [*Maruca vitrata* (Fabricius)]、薊馬類與蟎類等，但在台灣僅黑豆蚜與豆莢螟有以長豇豆為寄主的研究報告 (Liao & Lin 2000; Kuo & Chen 2004)，而長豇豆上薊馬的種類則無正式調查紀錄，僅於防治資料上提到有花薊馬 [*Thrips hawaiiensis* (Morgan)]、南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny) 與豆花薊馬 [*Megalurothrips usitatus* (Bagnall)] 等。相較於其他長豇豆害蟲可在發生初期就被察覺，薊馬的危害通常是農民在採收長豇豆時發現豆莢外表皮褐化且粗糙，才察覺長豇豆被薊馬危害，因此農民常採取高頻度的藥劑防治，希望能降低薊馬的危害風險。如此不但提高了農藥的使用量，也增加薊馬發生抗藥性的風險，所以建立長豇豆上薊馬類的綜合管理 (integrated pest management; IPM) 有其必要性。

IPM 是目前農業生產中減少化學農藥使用的核心工作，主要目的是當蟲害密度到達經濟

投稿日期：2020 年 9 月 9 日；接受日期：2021 年 6 月 7 日。
[*] 通訊作者：hslai@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所應用動物組研究員。台灣 台中市。

閥值 (ecomonic threshold) 時才進行害蟲化學農藥防治，進而減少農藥的使用 (Silva *et al*. 2017)。取樣計畫 (sampling plan) 是 IPM 重要的組成，利用取樣計畫能早期發現且持續監測有害生物族群變動 (Abdullah *et al*. 2015; Espinoza *et al*. 2016)。一個標準化的取樣計畫須包括取樣單位、取樣技術與固定數量的樣本 (Silva *et al*. 2017)。

薊馬具個體小、善躲藏於緊密縫隙與族群高度聚集等特點，這些特點會影響取樣技術的準確度 (accuracy) 與精密度 (precision)，因此使用者應取決於取樣目的、可用資源與所需要的精密度來選擇薊馬的取樣計畫 (Sutherland & Parrella 2011)。常見於薊馬絕對族群密度估算的取樣技術有液體清洗法、敲擊法與驅除收集法等，在薊馬相對族群密度估算則有利用掃網取樣或顏色黏板誘集取樣 (Lewis 1973; Southwood 1995)。絕對族群密度估算可以計算薊馬若蟲與成蟲的數量，作為整體防治決策研究的依據，但是取樣時會容易造成植物損傷，甚至影響產量，因此在商業上使用需針對不同作物分別考量 (Cho *et al*. 1998; Allan & Gillett-Kaufman 2018)，且絕對族群估算在田間實際執行非常耗費時間與人力，因此並不廣泛使用於田間害蟲管理上 (Pedigo 1999)。利用黏板誘集薊馬則不會造成植物損傷，但黏板上的薊馬數量僅能代表調查時間內薊馬成蟲的數量，因此適合作為監測薊馬早期入侵與施藥時機的指標 (Lewis 1997; Allan & Gillett-Kaufman 2018)。

為改善目前長豇豆園內高頻度施藥防治薊馬類的情形，因此須建立取樣計畫以提供農民施藥防治薊馬類的依據。本研究目的在於利用黏板建立長豇豆園內薊馬類取樣計畫，以提供農民監測薊馬早期入侵與判斷施用藥劑防治薊馬的時機。第一調查台灣南部長豇豆園內花朵中薊馬的種類。第二為了降低農民對採花或採葉可能影響長豇豆產量的疑慮，所以選擇黏板誘集作為長豇豆園內薊馬類的取樣技術，為評估適合作為調查薊馬類數量的顏色黏板，因此測試長豇豆園內薊馬類對不同顏色的偏好。第三以薊馬偏好的顏色黏板大面積調查長豇豆園內的薊馬類成蟲，評估其分散情形。第四估算出長豇豆園內利用黏板調查薊馬成蟲所需要的黏板數量，完成長豇豆園內薊馬標準化取樣計畫。希冀未來能提供作為判斷長豇豆園內以藥劑防治薊馬類的時機，成為建構長豇豆上薊馬綜合管理的基礎。

材料與方法

長豇豆花內薊馬種類與數量

2013 年 4 月分別選擇屏東縣里港鄉與高雄市美濃區各一處長豇豆田區，在長豇豆開花期進行採花調查，每隔 7 d 採樣一次，連續採樣 3 次。每次於田區內隨機採 60 朵長豇豆花朵，分別以封口袋攜回實驗室。將薊馬浸泡於 75% 的酒精中保存，製作簡易玻片標本於光學顯微鏡下鑑定薊馬成蟲種類，並計算每朵花內的不同薊馬種類成蟲數量。以 SPSS 10.0 for Windows 統計軟體進行非成對學生氏 *t* 檢定 (unpaired Student’s *t*-test)，檢定每次取樣同一田區每朵花內兩種薊馬成蟲數量是否有顯著性差異 ($P < 0.05$)。

薊馬對顏色的偏好

分別於 2013 年 8 月至 9 月與 2013 年 11 月至 2014 年 1 月在里港長豇豆田區，以及 2014 年 1 月至 3 月與 2015 年 3 月至 5 月在美濃長豇豆田區進行試驗。在長豇豆開花初期即於田區隨機選擇 4 個試驗點，即為 4 重複。於每一個試驗點棚架頂部之尼龍網分別懸掛黃色、藍色、綠色與白色黏板 (高冠企業股份有限公司，台灣南投市) 各一張，每張黏板大小為 10.7 cm × 15.0 cm，黏板間距離為 35 cm，圍成一正方形。每隔 7 d 收集與更換黏板，黏板以封口袋固定攜回實驗室，於實體顯微鏡下鏡檢，並計算每張黏板上薊馬數量。若各處理的變方 (S^2) 遠大於平均值 ($\bar{x}$)，則將不同顏色黏板所誘集到的薊馬數據做平方根轉換 ($\sqrt{x + 0.5}$)，以穩定數據的變方 (Wang *et al*. 2011)。之後進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若有顯著性差異 ($P < 0.05$)，則再以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 進行事後檢定，分析各處理間的差異顯著性 ($P < 0.05$)，並以 SigmaPlot 10.0 軟體繪圖。

誘捕薊馬效能

分別於 2015 年 3 月至 5 月 (A 區)、5 月至 6 月 (B 區)、6 月至 7 月 (C 區) 與 10 月至 11 月 (D 區) 在高雄市美濃區的長豇豆田區進行試驗。在長豇豆開花初期懸掛黏板，每張黏板大小為 10.7 cm × 15.0 cm，每張黏板間距離 10 m，將前項顏色偏好試驗中薊馬最偏好的兩種顏色 (藍色和黃色) 分別隔行懸掛，A 區兩種顏色黏板各懸掛 28 張，B 區各懸掛 18 張，C 區各懸掛 18 張，D 區各懸掛 14 張。每隔 7 d 收集與更換黏板，黏板以封口袋固定攜回實驗室，於實體顯微鏡下計算每張黏板上的薊馬數量。以 SPSS 10.0 for Windows 統計軟體進行非成對學生氏 *t* 檢定，檢定每次試驗兩種顏色黏板所誘得的蟲數是否有顯著性差異 ($P < 0.05$)，圖則是以 SigmaPlot 10.0 軟體繪製。

黏板上薊馬的空間分布

於長豇豆開花初期在棚架頂端之尼龍網懸掛藍色黏板，每張黏板大小為 10.7 cm × 15.0 cm，每張黏板間距離為 10 m，每隔兩行懸掛黏板。每隔 7 d 收集並更換黏板，直至採收期結束。2013 年 3 月至 5 月於屏東縣里港鄉 A1 田區 (2,100 m^2) 懸掛 35 張黏板，6 月至 7 月於屏東縣里港鄉 A2 田區 (1,260 m^2) 懸掛 21 張黏板，8 月至 9 月於屏東縣里港鄉 A3 田區 (1,500 m^2) 懸掛 25 張黏板，2015 年 5 月至 6 月於高雄市美濃區 B1 田區 (1,080 m^2) 懸掛 18 張黏板，6 月至 7 月於高雄市美濃區 B2 田區 (1,080 m^2) 懸掛 18 張黏板，10 月至 11 月於高雄市美濃區 B3 田區 (840 m^2) 懸掛 14 張黏板。黏板以封口袋固定後攜回實驗室，於實體顯微鏡下計算每張黏板上薊馬數量，所收集的薊馬數據以 Taylor's power law 分析黏板誘捕薊馬在 6 處長豇豆園內的空間分布。

Taylor (1961) 提出 Taylor's power law 來說明昆蟲與其他動物物種在空間的分布型式，方程式為：$S^2 = am^b$。S^2 為樣本變方，*m* 為樣本均值，*a* 值是與樣本大小有關的尺度因子，*b* 值為物種聚集指數。*b* 值大於 1 表示物種為聚集型 (clumped)，*b* 值小於 1 為均勻型 (uniform)，*b* 值等於 1 為逢機型 (random)。通過對數轉換，以 $\log(S^2) = \log(a) + b\log(m)$ 線性迴歸來估算上述係數。藉由雙尾學生氏 *t* 檢定檢測分散指數 (*b*) 是否為 1，$t = (b - 1)/SE_b$，其中 SE_b 為斜率的標準誤差。計算出來的 *t* 值在自由度 $n - 2$ 及 $\alpha = 0.05$ 的 *t* 臨界值相比較，如果計算的 $t < t$ 臨界值，則將接受虛無假設 ($b = 1$)，表示空間分布為逢機型。若計算出的 $t > t$ 臨界值，則虛無假設被拒絕；若 $b > 1$，則為聚集型，而 $b < 1$，則為均勻型 (Tesfaye *et al*. 2016)。

最適設置之黏板數

最適取樣之樣本數是指可以滿足取樣目的並達到估算精密度期望值的樣本數，其精密度 (precision level; *D*) 以相對變異 (relative variation) 來表示，算式為：$D = \frac{SE}{m}$，*m* 為平均值，*SE* 為平均值的標準誤差。*D* 值為可接受的誤差，通常以小數表示，數值越小表示取樣的誤差越小，精密度就越高 (Sutherland & Parrella 2011)。利用 Taylor's power law 導出的需求樣本數的算式為：$N = \frac{am^{b-2}}{D^2}$，其中 *N* 為所需要的樣本數，*m* 為平均值，*a* 和 *b* 則是來自 Taylor's power law 的迴歸方程式 (Cochran 1977)。

將 Taylor's power law 分析 6 處長豇豆田區所得的 *a* 值與 *b* 值，分別代入需求樣本數公式，估算 *D* 值分別為 0.10、0.15 與 0.25 時所需的最適設置之黏板數，利用 SigmaPlot 10.0 軟體分別繪製 6 處長豇豆田區在每週每張黏板不同薊馬數量與所需黏板數量的關係曲線圖。考慮可接受的誤差與實際取樣工作量，田間取樣估算時 *D* 值多數設為 0.25 (Southwood 1995)，因此當 *D* 值為 0.25，將每週每張黏板上薊馬平均數量設為 10、20 與 30 隻時，估算 6 處長豇豆田區所需黏板數量。

結果

長豇豆花內薊馬種類與數量

於里港與高雄美濃所採到的長豇豆花內薊馬種類，經鑑定為豆花薊馬 [*Megalurothrips usitatus* (Bagnall)] 與台灣花薊馬 [*Frankliniella intonsa* (Trybom)]。數量調查結果如表 1，里港的長豇豆田區第一次採花所得薊馬平均數量為 3.3

± 3.7 隻，其中台灣花薊馬 3.2 ± 3.6 隻顯著多於豆花薊馬 0.1 ± 0.2 隻 (t = -6.79, df = 118, P < 0.05)。第二次採花的薊馬平均數量為 6.4 ± 5.6 隻，其中台灣花薊馬 6.4 ± 4.6 隻顯著多於豆花薊馬 0.2 ± 0.5 隻 (t = -10.23, df = 118, P < 0.05)。第三次採花薊馬平均數量為 6.4 ± 4.9 隻，其中台灣花薊馬 5.9 ± 4.6 隻顯著多於豆花薊馬 0.5 ± 0.8 隻 (t = -8.88, df = 118, P < 0.05)。美濃第一次採花的薊馬平均數量為 1.3 ± 1.5 隻，台灣花薊馬 0.6 ± 1.1 隻與豆花薊馬 0.7 ± 0.9 隻上沒有顯著差異 (t = 0.37, df = 118, P = 0.71)。第二次採花的薊馬平均數量為 1.3 ± 2.0 隻，其中豆花薊馬 0.9 ± 1.7 隻顯著多於台灣花薊馬 0.4 ± 0.7 隻 (t = 2.52, df = 118, P < 0.05)。第三次採花的薊馬平均數量為 1.5 ± 1.6 隻，其中豆花薊馬 1.2 ± 1.3 隻顯著多台灣花薊馬 0.4 ± 0.6 隻 (t = 4.41, df = 118, P < 0.05)。

薊馬對顏色的偏好

2013 年 8 月至 9 月於里港調查結果如圖 1A，在 8 次調查中，8 月 8 日與 8 月 29 日所調查 4 種顏色黏板誘集的薊馬平均蟲數分別為 1.0–3.0 與 0.5–6.0 隻之間，經轉換後分析，4 種顏色間沒有顯著性差異 ，而其餘 6 次調查中，則是 4 種顏色所誘得薊馬數量經轉換後分析，均有顯著性差異。但是 8 月 15 日與 9 月 5 日藍色黏板與黃色黏板所誘得薊馬數量經轉換後分析，兩者沒有顯著差異。 2013 年 11 月至 2014 年 1 月於里港調查結果如圖 1B，在 8 次調查中除了 12 月 4 日黃色黏板與藍色黏板所誘得薊馬數量經轉換後分析，兩者沒有顯著性差異外，其他 7 次調查皆為藍色黏板誘集蟲數多於其他顏色黏板，經轉換後分析，與其他顏色間有顯著性差異。2014 年 1 月至 3 月於美濃調查結果如圖 1C，在 8 次調查中，4 種顏色所誘得薊馬數量經轉換後分析，均有顯著性差異，但是 1 月 29 日、2 月 26 日、3 月 5 日與 3 月 12 日藍色黏板與黃色黏板所誘得薊馬數量經轉換後分析，兩者沒有顯著性差異。2015 年 3 月至 5 月於美濃調查結果如圖 1D，在 8 次調查中，4 種顏色所誘得薊馬數量經轉換後分析，均有顯著性差異，但是 3 月 26 日與 4 月 2 日藍色黏板與黃色黏板所誘得薊馬數量經轉換後分析，兩者沒有顯著性差異。

誘捕薊馬效能

由前項顏色偏好試驗中得知，黃色黏板與藍色黏板為長豇豆園內薊馬類偏好的2種顏色，長豇豆 A 區調查結果如圖 2A，在 8 次調查中，藍色黏板的薊馬數量皆顯著高於黃色黏板，其中 4 月 15 日數量相差 2.5 倍為最少，5 月 6 日相差 53.6 倍為最多。長豇豆 B 區調查結果如圖 2B，6 次調查中藍色黏板的薊馬數量皆顯著高於黃色黏板，其中 5 月 20 日數量相差 2.4 倍為最少，5 月 28 日數量相差 18.4 倍為最多。長豇豆 C 區調查結果如圖 2C，5 次調查中藍色黏板的薊馬數量皆顯著高於黃色黏板，其中 7 月 1 日相差 3.6 倍為最少，6 月 17 日相差 7.0 倍為最多。長豇豆 D 區調查結果如圖 2D，7 次調查中，除了 10 月 7 日與 10 月 15 日 2 種顏色黏板誘得薊馬蟲數沒有差異 (t = 1.78, df = 26, P > 0.05, t = 1.83, df = 26, P > 0.05) 外，其餘 5 次

表 1. 2013 年 4 月分別於里港和美濃採集 3 次長豇豆花內豆花薊馬與台灣花薊馬的平均數量。

Table 1. Number of adult *Megalurothrips usitatus* and *Frankliniella intonsa* in the flower of yardlong bean collected for three times in Ligang, Pingtung County, and Meinong, Kaohsiung City in April 2013, respectively.

	Number of adult thrips in flower (Mean ± *SD*)					
	1st		2nd		3rd	
Taxa	Ligang	Meinong	Ligang	Meinong	Ligang	Meinong
Megalurothrips usitatus	0.1 ± 0.2 b[z]	0.7 ± 0.9 a	0.2 ± 0.5 b	0.9 ± 1.7 a	0.5 ± 0.8 b	1.2 ± 1.3 a
Frankliniella intonsa	3.2 ± 3.6 a	0.6 ± 1.1 a	6.2 ± 4.6 a	0.4 ± 0.7 b	5.9 ± 4.6 a	0.4 ± 0.6 b
Total	3.3 ± 3.7	1.3 ± 1.5	6.4 ± 5.6	1.3 ± 2.0	6.4 ± 4.9	1.5 ± 1.6

[z] Means following different letters in same column are significantly different (unpaired Student's t-test at P < 0.05).

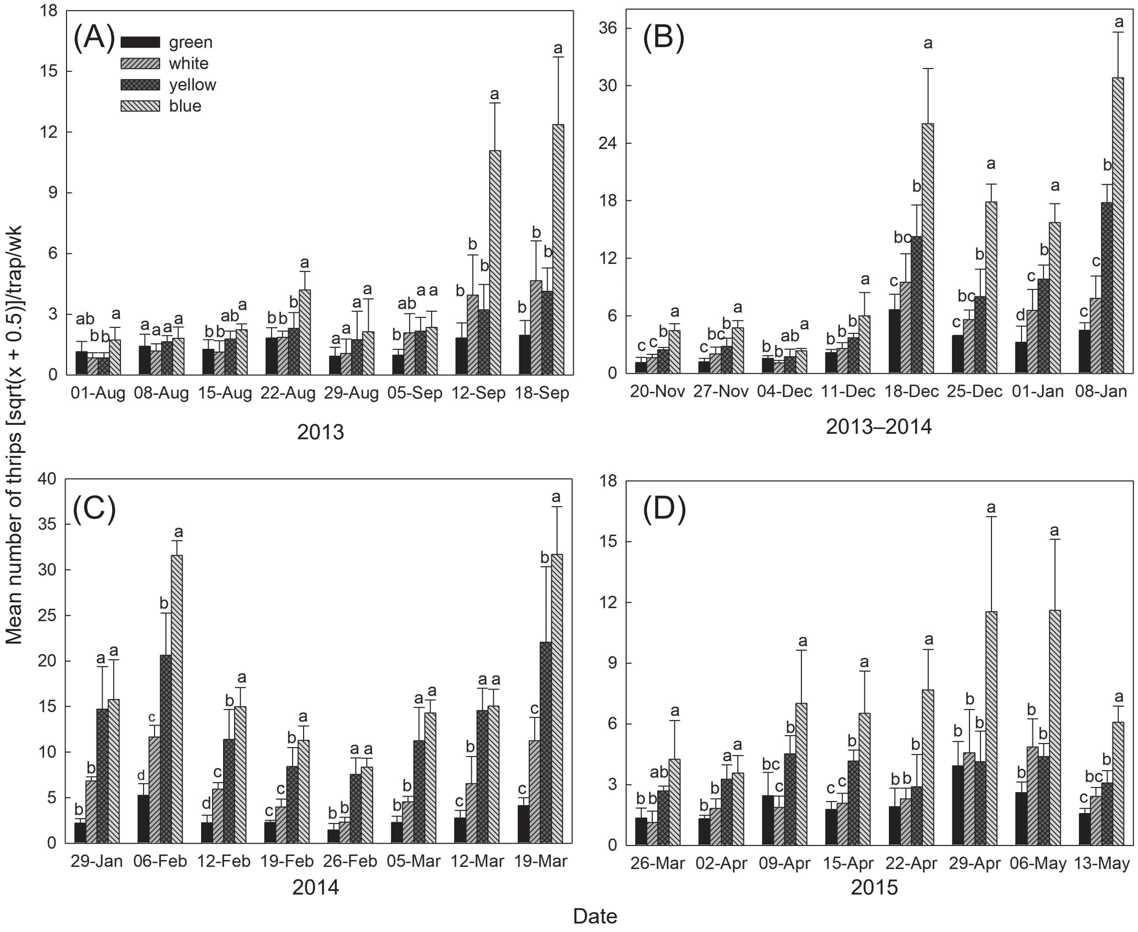


圖 1. 4 種顏色黏板在 4 處長豇豆園內薊馬的誘引能力。

Fig. 1. Attractiveness of four colors sticky trap to thrips in 4 yardlong bean farms.
Means within a panel with different letters are significantly different (least significant difference test at $P < 0.05$).

藍色黏板的薊馬數量皆顯著高於黃色黏板，其中 10 月 15 日相差 1.8 倍為最少，11 月 4 日相差 6.6 倍為最多，同時在 10 月 1 日的結果發現，當黃色黏板尚未誘集到任何薊馬成蟲時，藍色黏板已經誘捕到薊馬成蟲。

黏板上薊馬的空間分布

將 6 處長豇豆田區每週藍色黏板上所誘得薊馬數量，以對數形式的 Taylor's power law 進行迴歸，所得 a 值、b 值與 R^2 值如表 2。里港 A1 區迴歸方程式為 $\log(S^2) = \log(0.79) + 1.67 \log(m)$，$t$ 值為 $14.64 > t_{0.01/2,10} = 3.169$。里港 A2 區迴歸方程式為 $\log(S^2) = \log(1.54) + 1.63 \log(m)$，$t$ 值為 $4.15 > t_{0.01/2,5} = 4.032$。里港 A3 區迴歸方程式為 $\log(S^2) = \log(0.45) + 1.92 \log(m)$，$t$ 值為 $8.81 > t_{0.01/2,5} = 4.032$。美濃 B1 區迴歸方程式為 $\log(S^2) = \log(1.13) + 1.73 \log(m)$，$t$ 值為 $9.98 > t_{0.01/2,4} = 4.604$。美濃 B2 區迴歸方程式為 $\log(S^2) = \log(1.16) + 1.81 \log(m)$，$t$ 值為 $10.48 > t_{0.01/2,3} = 5.841$。美濃 B3 區迴歸方程式為 $\log(S^2) = \log(1.29) + 1.75 \log(m)$，$t$ 值為 $8.46 > t_{0.01/2,5} = 4.032$。6 處長豇豆田區經 Taylor's power law 分析後，黏板上薊馬在長豇豆田區內的空間分布皆為聚集型。

最適設置之黏板數

將 6 個田區利用 Taylor's power law 對數

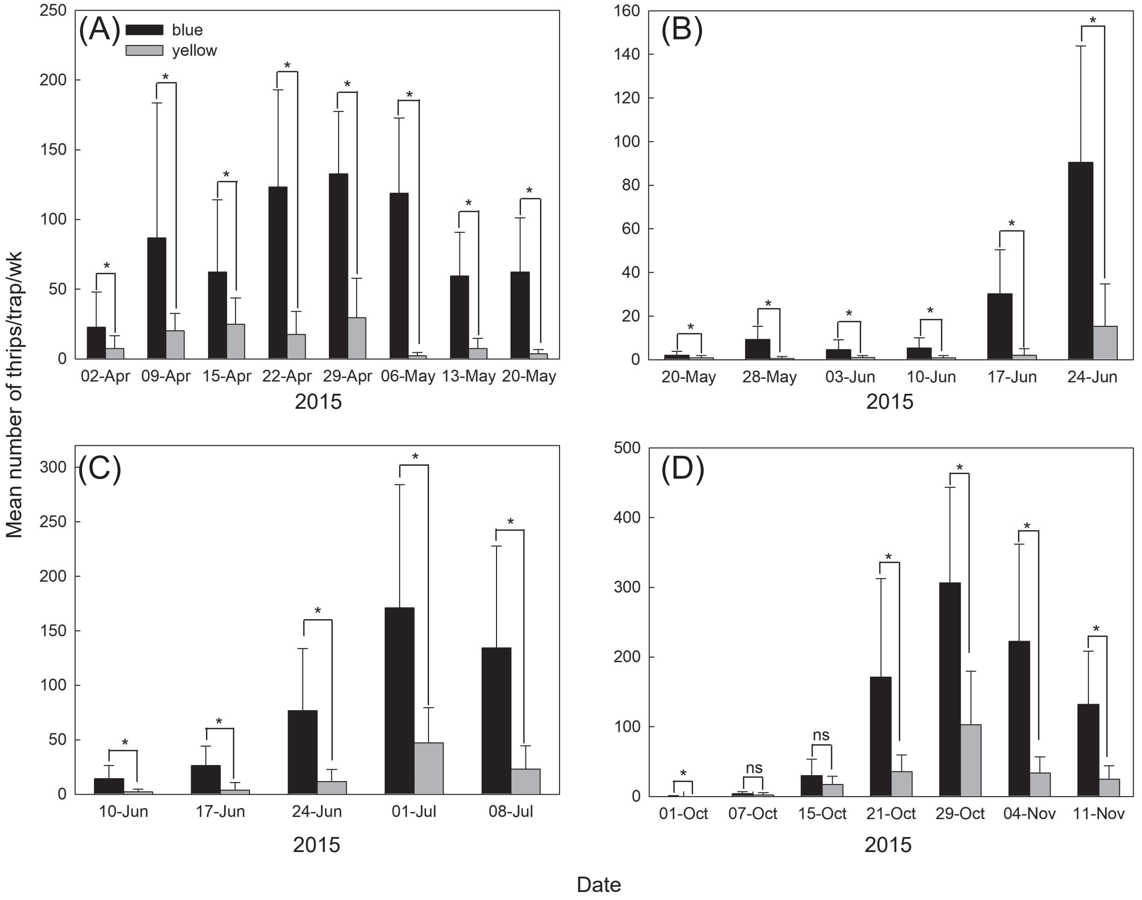


圖 2. 藍色黏板與黃色黏板在 4 處長豇豆園內對薊馬的平均捕獲數量。

Table 2. Mean captures of thrips on blue sticky traps and yellow sticky traps in 4 yardlong bean farms. Asterisks indicate significant differences (unpaired Student's t-test at $P < 0.05$); ns indicates no significant difference was detected.

表 2. 針對 6 處長豇豆園內藍色黏板上的薊馬數量估算 Taylor's power law 參數。

Table 2. The Taylor's power law parameters estimated for the number of thrips on the blue sticky trap derived from 6 yardlong bean farms^z.

Location [farm size (m^2)]	Traps/farm	n	a	b	SE_b	R^2	t	P
Ligang A1 (2,100)	35	12	0.79	1.67	0.044	0.99	14.64	< 0.001
Ligang A2 (1,260)	21	7	1.54	1.63	0.153	0.96	4.15	< 0.001
Ligang A3 (1,500)	25	7	0.45	1.92	0.104	0.99	8.81	< 0.001
Meinong B1 (1,080)	18	6	1.13	1.73	0.073	0.99	9.98	< 0.001
Meinong B2 (1,080)	18	5	1.16	1.81	0.081	0.99	10.48	< 0.001
Meinong B3 (840)	14	7	1.29	1.75	0.089	0.99	8.46	< 0.001

^{z} n is number of data points, b is aggregation coefficient or slope, R^2 is regression coefficient of $\log(m)$ vs. $\log(s^2)$, t is t value calculated to test H_0 $b = 1$. All b values were significantly > 1 indicating aggregated dispersion patterns.

形式迴歸分析所得 *a* 值與 *b* 值，分別代入取樣數估算公式，精密度 (*D*) 設為 0.10、0.15 與 0.25。結果如圖 3，若以每週每張黏板上平均薊馬數量 10 隻為標準，在里港 A1 區分別需要 34.1、15.1 與 5.5 張黏板；在里港 A2 區分別需要 66.5、29.6 與 10.6 張黏板；在里港 A3 區則分別需要 36.9、16.4 與 5.9 張黏板；在美濃 B1 區分別需要 59.9、26.6 與 9.6 張黏板；在美濃 B2 區分別需要 75.2、33.4 與 12.0 張黏板；在美濃 B3 區則分別需要 72.7、32.3 與 11.6 張黏板。

當精密度設為 0.25，每週每張黏板誘得的薊馬平均數量分別為 10、20 與 30 隻時，所需黏板數量如表 3。里港 A1 區所需的黏板數依序分別為 5.5、4.2 與 3.7 張；里港 A2 區所需的黏板數依序分別為 10.6、8.3 與 7.1 張；里港 A3 區所需的黏板數依序分別為 5.9、5.6 與 5.4 張；美濃 B1 區所需的黏板數依序分別為 9.6、7.9 與 7.1 張；美濃 B2 區所需的黏板數依序分別為 12.0、10.5 與 9.8 張，美濃 B3 區所需的黏板數依序分別為 11.6、9.8 與 8.9 張。每週每張黏板誘得的薊馬平均數量越多，所需要的黏板數量愈少。

討論

台灣南部的里港與美濃為長豇豆主要產地，常見以ㄇ字架作為其生長的支架，當春季至秋季所種植的長豇豆進入開花期，約 1–1.5 個月後長豇豆植株會布滿整個ㄇ字架，造成植株生長空間受到限制，而進入採收期後期。由於本研究未觀察到長豇豆葉片受到薊馬危害的情形，因此僅於開花高峰期 1 個月內每隔 7 d 連續採花調查 3 次，記錄每朵長豇豆花內的薊馬種類與數量。結果顯示台灣南部長豇豆花內常見的薊馬種類是台灣花薊馬與豆花薊馬，與其他國家在豇豆上的薊馬種類有所差異。Qiu *et al*. (2017) 指出中國海南豇豆園區內除了豆花薊馬為優勢薊馬種類，還有台灣花薊馬、南黃薊馬與花薊馬。在西非是以非洲豆薊馬 [*Megalurothrips sjostedti* (Trybom)] 為主，其危害豇豆花芽與花朵造成壞死或脫落 (Ngakou *et al*. 2008)。在美國中南部則是菸草花薊馬 [*Frankliniella fusca* (Hinds)] 為主，其危害豇豆葉片導致葉片捲曲黃化影響豇豆產量 (Jones *et al*. 2009)。在印度部分地區則是蔥薊馬 (*Thrips tabaci* Lindeman) 導致豇豆大量減產 (Muchero *et al*. 2010)。

在里港與美濃的長豇豆田區內豆花薊馬與台灣花薊馬的數量多寡有差異，但隨著開花數量的增加，豆花薊馬的平均數量在美濃或里港地區都有上升的趨勢 (如表 1)。在里港的 3 次調查中，長豇豆花內台灣花薊馬的數量明顯高於豆花薊馬，推測可能與里港的長豇豆園區周圍通常為種絲瓜、胡瓜、苦瓜與茄子等作物有關，這些作物皆為台灣花薊馬的寄主，因此在台灣花薊馬遷移時容易擴散至長豇豆上，導致台灣花薊馬成為該地長豇豆花內主要的薊馬種類。相較之下，美濃的長豇豆花內則是豆花薊馬的數量高於台灣花薊馬，推測可能與美濃的長豇豆園周圍或前期作物通常是種植敏豆、紅豆或大豆等有關，這些作物皆為豆花薊馬的寄主，導致豆花薊馬成為該地長豇豆花內主要的薊馬種類。

本研究在台灣南部長豇豆田間僅調查到豆花薊馬與台灣花薊馬，但是由於其他國家的豇豆有被不同薊馬種類危害的情形，推測台灣的長豇豆可能有被其他薊馬種類危害的風險，尤其是取食葉片的薊馬類。如果危害花朵與危害葉片的薊馬同時發生時，農民在田間不容易分別取樣監測，因此本研究規劃適合於長豇豆園內薊馬類的取樣計畫以方便農民使用。評估薊馬存在與族群密度常用的方法是摘花取樣，與黏板誘集薊馬相比，摘花取樣更能估算薊馬密度，花朵樣本可以觀察到薊馬幼蟲與成蟲，而黏板只能採樣到薊馬成蟲，但摘花取樣的缺點在於作物未開花期不容易監測到薊馬，此時黏板可以在植物不同生長階段輔助監測薊馬數量 (Ugine *et al*. 2011)。薊馬在作物上的活動受到環境溫度影響，尤其是薊馬成蟲的活

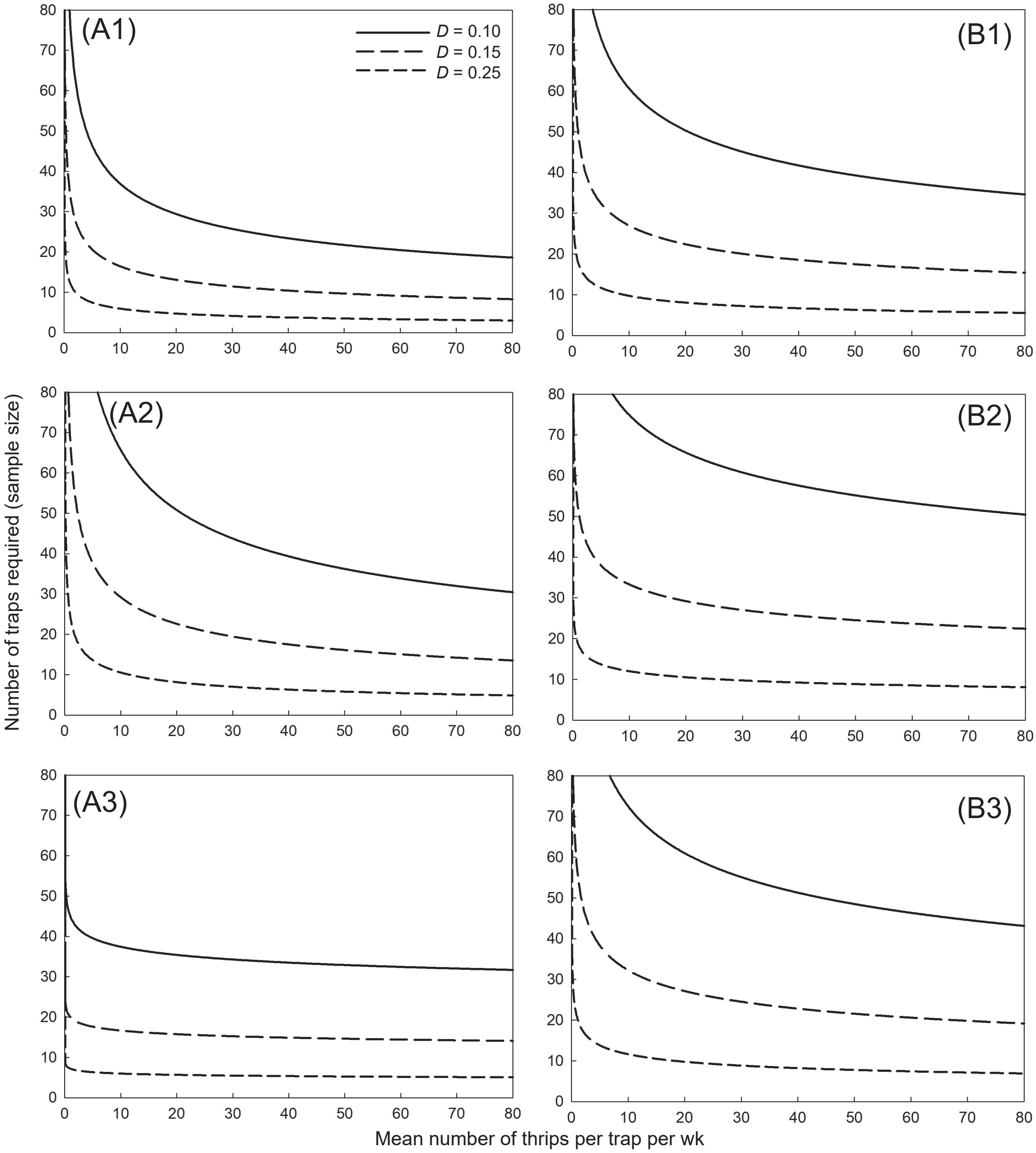


圖 3. 6 處長豇豆園中每週每張藍色黏板薊馬數量與在不同精密度下 (精密度 0.10、0.15 與 0.25) 所需的黏板數量之關係。

Fig. 3. Relationship between the mean number of thrips per blue sticky trap weekly and the number of traps required (sample size) for the precision level (*D* = 0.10, 0.15 and 0.25) in 6 yardlong bean farms.

動 (Aliakbarpour & Rawi 2010)，因此摘花或摘葉取樣調查薊馬族群可能會因當時環境條件的不同而差異，而黏板誘集是調查 1 wk 或是更長時間內薊馬成蟲數量，誘引數量較不易受到短時間環境因子的影響 (Steiner & Goodwin 2005)。以往黏板昆蟲數量計算以人工計數為

表 3. 6 處長豇豆園內在每週每張黏板薊馬數量為 10、20 及 30 隻時所需黏板數量 (精密度 0.25)。

Table 3. Number of sticky traps required (sample size) at the precision level (D = 0.25) when the mean number of thrips per trap per week is 10, 20 and 30 in 6 yardlong bean farms.

	Estimated number of sticky traps hung when different number of thrips per trap weekly		
Location [farm size (m^2)]	10	20	30
Ligang A1 (2,100)	5.5	4.2	3.7
Ligang A2 (1,260)	10.6	8.3	7.1
Ligang A3 (1,500)	5.9	5.6	5.4
Meinong B1 (1,080)	9.6	7.9	7.1
Meinong B2 (1,080)	12.0	10.5	9.8
Meinong B3 (840)	11.6	9.8	8.9

主，雖然有提出各種替代計數策略來減少計數的工作量與時間，但是目前已經開發自動計數的有害生物辨識系統，將能大幅提升計算黏板害蟲數量的效率與提供非專業人員於田間運用 (Espinoza *et al*. 2016)。

有色黏板是一種快速且高經濟效率的監測薊馬族群工具，不同種類的薊馬會被不同顏色所誘集，而黏板上的薊馬數量與植物上的薊馬族群數量存在顯著的正相關，表明黏板對薊馬監測的有效性 (Muvea *et al*. 2014)。薊馬成蟲對不同顏色黏板的反應可能因薊馬種類、覓食行為、作物種類、懸掛高度與日光照射而有不同 (Allan & Gillett-Kaufman 2018)。本研究中，相較於黃色、白色與綠色，藍色在長豇豆園內誘捕的薊馬數量最多 (圖 1)，此結果與 Tang *et al*. (2016) 在中國海南長豇豆園的試驗相同。Chang (1990) 在屏東紅豆田以水盤調查指出豆花薊馬偏好藍色。台灣花薊馬在草莓、苦瓜、華南忍冬與豌豆上皆偏好藍色 (Seo *et al*. 2006; Ou *et al*. 2012; Chen *et al*. 2017; Pobozniak *et al*. 2020)，但是 Mao *et al*. (2018) 指出台灣花薊馬在種植於溫室內的豇豆上偏好白色黏板。其他國家的豇豆會被南黃薊馬或花薊馬 [*Thrips hawaiiensis* (Morgan)] 危害 (Qiu *et al*. 2017)，而南黃薊馬與花薊馬是在台灣作物上常見的薊馬種類，兩者皆是藍色黏板誘捕數量高於黃色黏板 (Chiu & Wu 1993; Chen 2000)。

由不同時間點進行 4 種顏色誘捕薊馬的結果中，發現有部分時段藍色黏板所誘得蟲數與黃色黏板差異不顯著 (圖 1)，因此選擇藍色黏板與黃色黏板進行田間誘捕效果評估。為降低長豇豆種植時間、周圍作物種類或環境因子對長豇豆園內薊馬種類與數量的影響，造成長豇豆園內薊馬類對顏色的偏好有所差異，因此 2015 年選擇 4 個不同的田區與不同的開花時間點，評估黃色黏板與藍色黏板誘捕整個長豇豆園內薊馬數量的效果。發現不管長豇豆是在哪一個田區或哪一個時間點開花，以及薊馬的族群數量多寡，藍色黏板的誘捕效果顯著高於黃色黏板 (圖 2)。由此可知，藍色黏板是誘捕長豇豆園內薊馬類較佳的顏色。此結果與 Qiu *et al*. (2015) 在中國海南豇豆園內豆花薊馬顏色偏好試驗的結果相同，而 Tang *et al*. (2016) 的研究更指出藍色黏板所捕獲的薊馬數量與花朵解剖樣本中薊馬的數量具高度的相關性。黃色黏板是廣泛使用於田間害蟲監測的工具，包括粉蝨、蚜蟲、潛蠅、果實蠅類與部分薊馬等 (Pinto-Zevallos & Vanninen 2013)，但是在本研究中發現黃色黏板對台灣南部長豇豆園內薊馬的誘捕效率不高。Tang *et al*. (2016) 更指出黃色黏板對豇豆園內有益昆蟲的誘引能力更勝於藍色黏板，因此藍色黏板較適合用於誘殺與監測長豇豆園內薊馬類的工具。

空間分布是物種最典型的生態特性之一，通常以聚集指標來作為判斷的依據，聚集指標是以變方 (variance) 與平均值 (mean) 為基礎發展，Taylor's power law 為其中之一 (Taylor 1984)。本研究為降低種植時間、種植地點、種植面積與環境因子對薊馬空間分布的影響，選擇不同的 6 塊田區進行試驗調查。以 Taylor's power law 分析 6 處不同面積的長豇豆田

區利用藍色黏板誘集薊馬成蟲的數據，6 個迴歸方程式的 R^2 值皆達到 0.96 以上，表示 Taylor's power law 能描述 6 處長豇豆園內藍色黏板誘得薊馬數量經過統計後之變方與平均值的相關性。6 個迴歸方程式的 *b* 值皆顯著大於 1，表示以黏板誘得薊馬成蟲在長豇豆園內為聚集型 (表 2)，並且種植時間、地點、面積與環境因子等因素並未影響分布型式。Fan *et al*. (2013) 於中國海南長豇豆園內取花調查豆花薊馬的空間分布情形，指出無論是垂直空間或是水平空間薊馬均呈聚集分布，而 Chang (1992) 在紅豆開花期間豆花薊馬隨蟲數增加而呈聚集分布。

目前已有柑橘上亞洲柑橘木蝨、葡萄上葡萄粉介殼蟲與 grass pea 上豌豆蚜以黏板為主的取樣計畫 (Hall & Hentz 2010; Bahder *et al*. 2013; Tesfaye *et al*. 2016)。Steiner & Goodwin (2005) 指出黏板上的薊馬成蟲數量與前一週花朵內的成蟲數量有關，考慮決策可能出現嚴重的延遲，所以黏板須採取較少蟲數作為門檻。Tesfaye *et al*. (2016) 指出當取樣的基本單位是陷阱的數量，而不是植物或葉片的數量時，設置過多陷阱將不適合田間實際操作。使用黏板的目的在於早期發現與持續監測 (Allan & Gillett-Kaufman 2018)，因此本研究先以之前田間實務經驗來估算早期發現與持續監測所需設置的黏板數量。若是將每週每張黏板上 10 隻薊馬做為早期發現的標準，而每週每張黏板 30 隻薊馬做為持續監測的標準。本研究中 6 處長豇豆田區在不同精密度下需要的黏板數估算如圖 3，6 處長豇豆園區的需要黏板數量曲線圖中，若所需每週每張黏板上的蟲數越少，則所需要的黏板數量就越多。當每週每張黏板上平均薊馬數量 10 隻，精密度 0.10 時 6 處長豇豆園區所需的黏板數量大約是精密度 0.25 時的 6 倍，因此在蟲害管理上精密度 0.25 為較能被農民所接受的工作負擔。在精密度 0.10 時，A1 區與 A3 區所需要的黏板數量低於另外 4 處，尤其在每週每張黏板上蟲數越少時越明顯，這可能與這兩處在 Taylor's power law 迴歸分析時 *a* 值小於 1 有關，其他 4 處則是大於 1 (表 2)。比較種植面積與需要的黏板數量，由表 3 可知，在精密度 0.25 與每週每張黏板上 10 隻薊馬時，面積最大的 A1 區時，達到所需要的黏板數量為 5.5 張黏板，而面積最小的 B3 區卻高達 11.6 張黏板，面積相同的 B1 與 B2 田區則分別為 9.6 與 12.0 張黏板，表示田區面積與需要的黏板數並無明顯關係，薊馬在田間空間分布情形才是決定需要黏板數量的關鍵。

本研究中藍色黏板對於長豇豆園內薊馬類的誘捕能力高於其他顏色黏板，因此適合用於薊馬發生初期的監測以及長豇豆採收期誘殺薊馬成蟲。在美濃地區於冬季裡作種植紅豆與敏豆時，在長豇豆園外更需要懸掛藍色黏板以降低豆花薊馬初期入侵的蟲數，可延緩園內豆花薊馬嚴重發生的時間，降低化學農藥使用的頻率。在面積小於 2,000 m^2 的長豇豆園內，若以每週每張藍色黏板平均蟲數為 30 隻為藥劑防治施用標準，在精密度 0.25 時，則僅需在田區內隨機懸掛 10 張藍色黏板便足夠作為長豇豆園內薊馬類藥劑防治的依據。一個能被農民採用的取樣計畫須具有成本效益、時間效率、對使用者友善與準確度等特性 (Nansen *et al*. 2008; Ugine *et al*. 2011)。本研究利用少量的藍色黏板建立長豇豆園內薊馬類取樣計畫，不但具有監測薊馬成蟲族群變動的準確度，同時節省農民需要投入的成本與時間，而且收回黏板計算薊馬數量比大太陽下調查花朵內薊馬數量的操作，對農民更為友善，因此這個取樣計畫符合早期發現與持續監測的目的，以及農民田間實際使用的實用性。

引用文獻

Abdullah, Z. S., B. P. Greenfield, K. J. Ficken, J. W. Taylor, M. Wood, and T. M. Butt. 2015. A new attractant for monitoring western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* in protected crops. SpringerPlus 4:89. doi:10.1186/s40064-015-0864-3

Aliakbarpour, H. and C. S. M. Rawi. 2010. Diurnal activity of four species of thrips (Thysanoptera: Thripidae) and efficiencies of three nondestructive sampling techniques for thrips in mango inflorescences. J. Econ. Entomol. 103:631–640. doi:10.1603/ec09167

Allan, S. A. and J. L. Gillett-Kaufman. 2018. Attraction of thrips (Thysanoptera) to colored sticky traps in

a Florida olive grove. Fla. Entomol. 101:61–68. doi:10.1653/024.101.0112

Bahder, B. W., R. A. Naidu, K. M. Daane, J. G. Millar, and D. B. Walsh. 2013. Pheromone-based monitoring of *Pseudococcus maritimus* (Hemiptera: Pseudococcidae) populations in Concord grape vineyards. J. Econ. Entomol. 106:482–490. doi:10.1603/ec12138

Chang, C. M., F. J. Jan, and C. C. Su. 2018. Identification and characterization of phyllody phytoplasma associated with *Vigna sesquipedalis* in Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 4:53–67. (in Chinese with English abstract)

Chang, N. T. 1990. Color preference of thrips (Thysanoptera: Thripidae) in the adzuki bean field. Plant Prot. Bull. 32:307–316.

Chang, N. T. 1992. Dispersion patterns of bean flower thrips, *Megalurothrips usitatus* (Bagnall), (Thysanoptera: Thripidae) on flowers of adzuki bean. Plant Prot. Bull. 34:41–53.

Chen, J. Y., L. M. Niu, L. Li, D. Y. Han, F. P. Zhang, and Y. G. Fu. 2017. Field trapping effect of different colors sticky cards to *Frankliniella intonsa*. J. Environ. Entomol. 39:1169–1176. (in Chinese with English abstract) doi:10.3969/j.issn.1674–0858.2017.05.26

Chen, M. C. 2000. Integrated pest management for *Thrips palmi* Karny on eggplant. Res. Bull. KDARES 11:9–21. (in Chinese with English abstract) doi:10.6958/RBKDAIS.200006.0009

Chiu, H. L. and C. Y. Lin. 2015. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Germplasm Illustrations. Special Publication of TARI No. 190. Taichung, Taiwan. 95 pp. (in Chinese)

Chiu, H. T. and M. Y. Wu. 1993. Attractiveness of color trap to *Thrips hawaiiensis* (Morgan) (Thysanoptera: Thripidae) in the field. Formosan Entomol. 13:229–234. (in Chinese with English abstract) doi:10.6660/TESFE.1993022

Cho, K., S. H. Kang, and J. O. Lee. 1998. Spatial distribution of thrips in greenhouse cucumber and development of a fixed-precision sampling plan for estimating population density. J. Asia-Pacific Entomol. 1:163–170. doi:10.1016/S1226-8615(08)60017-5

Cochran W. G. 1977. Sampling Techniques. 3rd ed. John Wiley & Sons. New York, NY. 448 pp.

Espinoza, K., D. L. Valera, J. A. Torres, A. López, and F. D. Molina-Aiz. 2016. Combination of image processing and artificial neural networks as a novel approach for the identification of *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* on sticky traps in greenhouse agriculture. Comput. Electron. Agric. 127:495–505. doi:10.1016/j.compag.2016.07.008

Fan, Y. M., X. L. Tong, L. J. Gao, M. Wang, Z. Q. Liu, Y. Zhang, and Y. Yang. 2013. The spatial aggregation pattern of dominant species of thrips on cowpea in Hainan. J. Environ. Entomol. 35:737–743. (in Chinese with English abstract)

Hall, D. G. and M. G. Hentz. 2010. Sticky trap and stem-tap sampling protocols for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). J. Econ. Entomol. 103:541–549. doi:10.1603/EC09360

Jones, A. K., P. McLeod, and D. Steinkraus. 2009. Influence of cowpea planting date on tobacco thrips (Thysanoptera: Thripidae) abundance, within plant distribution, and foliar injury. J. Agric. Urban Entomol. 26:41–46. doi:10.3954/1523-5475-26.1.41

Kuo, M. H. and C. Y. Chen. 2004. Development and population parameters of the cowpea aphid, *Aphid craccivora* Koch (Hemoptera: Aphididae), at various constant temperatures. Formosan Entomol. 24:305–315. (in Chinese with English abstract) doi:10.6661/TESFE.2004027

Lewis, T. 1973. Thrips: Their Biology, Ecology and Economic Importance. Academic. London, UK. 349 pp.

Lewis, T. 1997. Pest thrips in perspective. p.1–13. *in*: Thrips as Crop Pests. (Lewis, T., ed.) CAB International. Wallingford, CT. 740 pp.

Liao, C. T. and C. S. Lin. 2000. Occurrence of the legume pod borer, *Maruca testulalis* Geyer (Lepidoptera: Pyralidae) on cowpea (*Vigna unguiculata* Walp) and its insecticides application trial. Plant Prot. Bull. 42:213–222.

Mao, L., Y. Chang, F. Yang, L. Zhang, Y. Zhang, and H. Jiang. 2018. Attraction effect of different colored cards on thrips *Frankliniella intonsa* in cowpea greenhouses in China. Sci. Rep. 8:13603. doi:10.1038/s41598-018-32035-8

Muchero, W., J. D. Ehlers, and P. A. Roberts. 2010. QTL analysis for resistance to foliar damage caused by *Thrips tabaci* and *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) feeding in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Mol. Breed. 25:47–56. doi:10.1007/s11032-009-9307-6

Muvea, A. M., M. M. Waiganjo, H. L. Kutima, Z. Osiemo, J. O. Nyasani, and S. Subramanian. 2014. Attraction of pest thrips (Thysanoptera: Thripidae) infesting French beans to coloured sticky traps with Lurem-TR and its utility for monitoring thrips populations. Int. J. Trop. Insect Sci. 34:197–206. doi:10.1017/S174275841400040X

Nansen, C., W. G. Meikle, J. Campbell, T. W. Phillips, and B. Subramanyam. 2008. A binomial and species-independent approach to trap capture analysis of flying insects. J. Econ. Entomol. 101:1719–1728. doi:10.1603/0022-0493-101.6.1719

Ngakou, A., M. Tamò, I. A. Parh, D. Nwaga, N. N. Ntonifor, S. Korie, and C. L. N. Nebane. 2008. Management of cowpea flower thrips, *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera, Thripidae), in Cameroon. Crop Prot. 27:481–488. doi:10.1016/j.cropro.2007.08.002

Ou, S., F. Jian, G. Su, H. Shi, and X. Huang. 2012. Taxis of *Frankliniella intonsa* on *Lonicera confusa* to different colors and field control effect of sticky cards. Plant Prot. 38:174–177. (in Chinese with English abstract)

Pedigo, L. P. 1999. Entomology and Pest Management. 3rd ed. Prentice-Hall Publishing. New York, NY. 691 pp.

Pinto-Zevallos, D. M. and I. Vanninen. 2013. Yellow sticky traps for decision-making in whitefly management: What has been achieved? Crop Prot. 47:74–84. doi:10.1016/j.cropro.2013.01.009

Pobozniak, M., K. Tokarz, and K. Musynov. 2020. Evaluation of sticky trap colour for thrips (Thysanoptera) monitoring in pea crops (*Pisum sativum* L.). J. Plant Dis. Prot. 127:307–321. doi:10.1007/s41348-020-00301-5

Qiu H. Y., K. Liu, P. Li, B. L. Fu, and L. D. Tang. 2015. Comparison of attracting effect of cowpea flower thrips [*Megalurothrips usitatus* (Bagnall)] with yellow and blue sticky cards. Chin. Horti. Abs. 2015:50–52. (in Chinese with English abstract)

Qiu, H. Y., B. L. Fu, L. D. Tang, J. Y. Chen, and K. Liu. 2017. Occurrence regularity of thrips in cowpea and evaluation of insecticides. Chin. Agric. Sci. Bull. 19:138–142. (in Chinese with English abstract) doi:10.11924/j.issn.1000-6850.casb16060144

Seo, M. J., S. J. Kim, E. J. Kang, M. K. Kang, Y. M. Yu, M. H. Nam, S. G. Jeong, and Y. N. Youn. 2006. Attraction of the garden thrips, *Frankliniella intonsa* (Thysanoptera: Thripidae), to colored sticky cards in a Nonsan strawberry greenhouse. Korean J. Appl. Entomol. 45:37–43. (in Korean with English abstract)

Silva, A. R., N. Rodrigues-Silva, P. S. Pereira, R. A. Sarmento, T. L. Costa, T. V. S. Galdino, and M. C. Picanço. 2017. Sampling plans for the thrips *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) in three lettuce varieties. J. Econ. Entomol. 110:2490–2496. doi:10.1093/jee/tox288

Southwood, T. R. E. 1995. Ecological Methods with Particular Reference to the Study of Insect Populations. 2nd ed. Chapman & Hall. London, UK. 524 pp.

Steiner, M. Y. and S. Goodwin. 2005. Management of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), in hydroponic strawberry crops: Using yellow sticky traps to determine action thresholds. Aust. J. Entomol. 44:288–292. doi:10.1111/j.1440-6055.2005.00466.x

Sutherland, A. M. and M. P. Parrella. 2011. Accuracy, precision, and economic efficiency for three methods of thrips (Thysanoptera: Thripidae) population density assessment. J. Econ. Entomol. 104:1323–1328. doi:10.1603/ec10415

Tang, L. D., H. Y. Zhao, B. L. Fu, Y. Han, K. Liu, and J. H. Wu. 2016. Colored sticky traps to selectively survey thrips in cowpea ecosystem. Neotrop. Entomol. 45:96–101. doi:10.1007/s13744-015-0334-1

Taylor, L. R. 1961. Aggregation, variance and the mean. Nature 189:732–735. doi:10.1038/189732a0

Taylor, L. R. 1984. Assessing and interpreting the spatial distributions of insect populations. Ann. Rev. Entomol. 29:321–357. doi:10.1146/annurev.en.29.010184.001541

Tesfaye, A., M. Wale, and F. Azerefegne. 2016. Dispersion patterns and sampling plans for the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris), on grass pea, *Lathyrus sativus* L. Int. J. Pest Manag. 62:30–39. doi:10.1080/09670874.2015.1088593

Ugine, T. A., J. P. Sanderson, S. P. Wraight, L. Shipp, K. Wang, and J. P. Nyrop. 2011. Binomial sampling of western flower thrips infesting flowering greenhouse crops using incidence-mean models. Environ. Entomol. 40:381–390. doi:10.1603/EN10085

Wang, Y. W., S. L. Ou, C. C. Wang, and Y. M. Pong. 2011. A study of interval estimation for contrasts of treatment means based on the data under variance-stabilizing transformation. Crop, Environ. Bioinform. 8:15–27.

Sampling Plan for Thrips (Thysanoptera: Thripidae) on Yardlong Bean in Southern Taiwan

Hsin-Shun Lai[1,*] and Feng-Chyi Lin[2]

Abstract

Lai, H. S. and F. C. Lin. 2021. Sampling plan for thrips (Thysanoptera: Thripidae) on yardlong bean in southern Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 70(3):217–229.

Yardlong bean (*Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis*) is one of the important legume vegetables in Taiwan. Thrips (Thysanoptera: Thripidae) is a group of the major pests of yardlong bean. To decide the best timing to use pesticides, it is necessary to establish a sampling plan for thrips in the yardlong bean farm and to gain an insight into the timing of pesticide application for controlling thrips. In this study, two thrips, *Megalothrips usitatus* (Bagnall) and *Frankliniella intonsa* (Trybom), were investigated in yardlong bean flowers in the farms in southern Taiwan. *M. usitatus* is the dominant species at Meinong, Kaohsiung City, whereas *F. intonsa* is the dominant species at Ligang, Pingtung County. Color preference for thrips in the yardlong bean farm was tested. The results showed that thrips preferred blue sticky traps, followed by yellow sticky traps. Comparing the attractive effectiveness of blue sticky traps and yellow sticky traps, the number of thrips attracted by blue sticky traps was significantly higher than those of yellow sticky traps. Therefore, blue sticky traps are better monitoring tools used for thrips in the yardlong bean farms. Taylor's power law was used to analyze the number of thrips trapped by sticky traps in 6 yardlong bean farms. The spatial distribution of thrips on the sticky traps in the yardlong bean farm was clumped. It was estimated by how many sticky traps are required for thrips management in 6 yardlong bean farms. In pest management, if 30 thrips are lured per sticky tarp per week as the timing of control, only 4–10 blue sticky traps are needed in each of these 6 farms of yardlong bean. In conclusion, the sampling plan for thrips on yardlong bean is recommended to use the blue sticky traps as a tool to monitor the early invasion of thrips. The results also provide better understanding of the best timing on chemical pesticide application to control thrips.

Key words: Yardlong bean, Thrips, Color preference, Spatial pattern, Sample size.

Received: September 9, 2020; Accepted: June 7, 2021.
* Corresponding author, e-mail: hslai@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
2 Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Taichung City, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University

Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University

Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editors

Huang, Li-Hsin
Pesticide Application Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 70 No. 3 September 30, 2021

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Ting-Fang Hsieh
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 413008, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw/jtar; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	https://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 234634, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 104472, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 400002, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330